Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztl. Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON HEPTANON-4 UND HEPTANON-2 IM URIN BEI STOFFWECHSELGESUNDEN U ND PATIENTEN MIT DIABETES MELLITUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gert Huesgen
aus Mönchengladbach

1978

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztl. Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON HEPTANON-4 UND HEPTANON-2 IM URIN BEI STOFFWECHSELGESUNDEN U ND PATIENTEN MIT DIABETES MELLITUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gert Huesgen
aus Mönchengladbach

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H.-E. Hoffmeister
1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Eggstein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Gupta

Herrn Prof. Dr. M. Eggstein danke ich für die Bereitstellung des hervorragend ausgerüsteten Arbeitsplatzes und die Übernahme der Aufgabe eines Doktorvaters.

Herrn Dr. H.M. Liebich danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Anregungen und Diskussionen bei der Durchführung der Experimente.

Herrn J. Wöll danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung eines Teils der Messungen sowie seine Fürsorge für die Betriebsbereitschaft des Massenspektrometers.

Zuletzt, aber nicht weniger herzlich, danke ich Herrn Bauer und Herrn Krebs, die mit ihrem handwerklichen Geschick viele Dinge - wie z.B. die Anfertigung des modifizierten Injektors - bewerkstelligten.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde publiziert:

H.M. Liebich, O. Al-Babbili, G. Huesgen, J. Wöll

Recognition of Profiles of Alcohols and Ketones in Urine of Patients with Diabetes mellitus by Gas Chromatography and Mass Fragmentography

Z. Anal. Chem., 279, 148, 1976

H.M. Liebich, G. Huesgen

Rapid Quantitative Microanalysis Of Ketones In Urine By Gas Chromatography - Mass Fragmentography

J. Chromatogr., 126, 465-474, 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536519_0092

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	ZUSAMMENFASSUNG	1
B.	EINLEITUNG	2
C.	METHODEN	4
1.	Apparative Ausstattung und Chemikalien ...	4
1.1.	Gaschromatographen	4
1.2.	Gekoppeltes Gaschromatographie-Massenspektrometrie-System	4
1.3.	Registriergeräte	5
1.3.1.	Kompensationsschreiber	5
1.3.2.	Registrierung von Massenspektren	5
1.4.	Chemikalien	6
2.	Belegung der Trennkapillaren	7
3.	Herstellung von Eich- und Standardlösungen	8
3.1.	Stammlösungen	8
3.2.	Lösungen für die Messung	8
4.	Vorbereitung des GC-MS Systems für die Massenfragmentographie und Wartung	9
5.	Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme	10
5.1.	Registrieren der Chromatogramme	10
5.2.	Auswertung der Chromatogramme	11
5.3.	Berechnung des Eichfaktors e	11
5.4.	t-Test	13
6.	Anwendung der MID-Einheit im Massenspektrometer CH 5	14
6.1.	Funktionsprinzip der MID-Einheit	14
6.2.	Funktionskontrolle der MID Einheit im MS CH 5	15
6.2.1.	Einfluß der Beschleunigungsspannung auf die Signalgröße	15
6.2.2.	Bestimmung der Trägheit der Hochspannungseinstellung bei Änderung der Beschleunigungsspannung	16
6.3.	Anwendung der MID Einheit bei quantitativen Bestimmungen	19

Seite

6.4. Anwendung der MID Einheit bei der Zuordnung von Fragmenten zu gaschromatographischen Banden 21

7. Methoden zur quantitativen Bestimmung von Heptanon-4 und Heptanon-2 in Urin und Serum 21

7.1. Direkte Injektion wässriger Probenlösungen 21

7.2. Quantitative Bestimmung der Heptanone mittels Kopfraumanalyse mit zwischengeschalteter Adsorption als Methode zur Konzentrierung 22

7.2.1. Adsorptionsröhrchen 22

7.2.2. System zur Durchführung der Kopfraumanalyse 22

7.2.3. Probenaufbereitung und Transfer in das Chromatographiesystem 23

7.2.4. Desorber zur schnellen Probeneinführung .. 23

7.2.5. Bestimmung einer Adsorptionskinetik 24

7.2.6. Bestimmung einer Eichkurve und der Reproduzierbarkeit für die Heptanonbestimmung mit der Kopfraummethode 25

7.3. Extraktionsmethode 25

7.3.1. Auswahl des Extraktionsmittels 25

7.3.2. Bestimmung der Extraktionsausbeute bei der Cyclohexanextraktion 25

7.3.3. Eichkurve für das Extraktionsverfahren und seine Reproduzierbarkeit 26

7.3.4. Bestimmung der thermischen Degradationskinetik des Heptanon-4 Vorläufers 27

7.3.5. Temperaturabhängigkeit der Degradationsreaktion 27

7.3.6. Bestimmung der Heptanone im Urin und ihre Reproduzierbarkeit 27

7.3.7. Bestimmung der Beständigkeit von Standardlösungen, Extrakten und Urinproben 28

7.4. Methode zur Bestimmung von Heptanon-4 im Serum 28

8. Versuche zur Identifizierung des Heptanon-4 Vorläufers 29

Seite

8.1. Versuch zur Ätherextraktion des Heptanon-4 Vorläufers 29

8.2. Versuch zur Derivatisierung und massenfragmentographischen Bestimmung des Heptanonvorläufers 29

9. Herkunft von Untersuchungsmaterial und klinischen Daten 30

D. ERGEBNISSE 31

1. Verwendung von Detergentien für die Standardlösungen 31

2. Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Heptanon-4 und Heptanon-2 im Urin 31

2.1. Ergebnisse durch die Methode der Direktinjektion wässriger Lösungen 31

2.2. Ergebnisse durch Anreicherung der Heptanone mit einem Verfahren der Kopfraumanalyse 33

2.2.1. Adsorptionsausbeute 33

2.2.2. Anwendung der Kopfraumanalyse zur Bestimmung der Heptanone im Urin 34

2.3. Ergebnisse der Extraktionsmethode 36

2.3.1. Extraktionsausbeute 36

2.3.2. Leistungsfähigkeit der Extraktionsmethode . 38

2.3.3. Messung der Heptanon-4 und Heptanon-2 Konzentration im Urin 40

2.3.4. Kinetik der Heptanon-4 Bildung 42

2.3.5. Temperaturabhängigkeit der Heptanon-4 Bildung 42

2.3.6. Reproduzierbarkeit der Heptanonbestimmung im Urin 45

2.3.7. Praktikabilität der Extraktionsmethode 46

3. Bestimmung von Heptanon-4 im Serum 47

4. Charakterisierung des Heptanon-4 Vorläufers 50

4.1. Ätherextraktion des Heptanon-4 Vorläufers 50

4.2. Versuch zur Identifizierung des Heptanon-4 Vorläufers 51

Seite

5.	Ergebnisse der Heptanonbestimmung im Urin	52
5.1.	Verteilung der Heptanon-4 und Heptanon-2 Ausscheidung bei den Patientengruppen	52
5.2.	Mittelwerte der Heptanonausscheidung bei den einzelnen Patientengruppen	56
5.3.	Korrelation der Heptanon-4 Ausscheidung mit anderen klinisch chemischen Parametern	57
5.4.	Heptanon-4 Ausscheidung bei dekompensiertem Kohlenhydratstoffwechsel	59
E.	DISKUSSION	60
1.	Vergleich der verschiedenen zur Heptanonbestimmung verwendeten Methoden	60
2.	Interferenzen mit dem inneren Standard	62
3.	Die Bedeutung von Heptanon-4 im Stoffwechsel	63
4.	Nimmt der Heptanon-4 Vorläufer am Metabolismus teil?	63
5.	Bedeutung des Heptanon-4 Vorläufers im Stoffwechsel	64
F.	LITERATURVERZEICHNIS	66

A. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur quantitativen Bestimmung von flüchtigen Komponenten des Urins - besonders von Heptanon-4 - getestet. Eine Einstufenextraktion mit Cyclohexan liefert bei 4-facher Anreicherung und 95 %iger Ausbeute einen gaschromatographisch analysierbaren Extrakt. Massenfragmentographische Messung von Eichextrakten mit Heptanon-3 als innerem Standard erlaubt in einem Konzentrationsbereich von $7{,}6 \times 10^{-9}$ - $1{,}5 \times 10^{-5}$ g/ml ($6{,}7 \times 10^{-14}$ - $1{,}3 \times 10^{-10}$ mol/l) bei einem Fehler zwischen 2 und 10 % die Heptanon-4 Bestimmung.

Heptanon-4 wird im Urin aus einem Vorläufer - wahrscheinlich einer β-Ketocarbonsäure - gebildet. Durch Verluste bei dieser Reaktion erhöht sich der Meßfehler auf 5 - 15 %. Nach quantitativer Proteinfällung kann, wie erste Ergebnisse zeigen, diese Methode auch zur Bestimmung von Heptanon-4 im Serum verwendet werden.

Die Anwendung der Methode bei Normalpersonen und Patienten mit Diabetes mellitus bringt signifikante Unterschiede in der Heptanon-4 respektive Heptanon-2 Ausscheidung in 24 h Sammelurinen. Bei stoffwechselgesunden Kontrollpersonen betrug die Ausscheidung 290 µg/24 h. In Abhängigkeit von der Schwere der diabetischen Stoffwechselstörung wurden erhöhte Heptanon-4 Ausscheidungen bis zu 2070 µg/24 h bei einem Patienten mit einem juvenilen Diabetes mellitus gefunden. Ein möglicher Syntheseweg zur Bildung von Heptanon-4 bzw. seines Vorläufers im Stoffwechsel wird diskutiert.

B. EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurden mit gaschromatographischen Methoden in Atemluft, Urin und Serum leicht flüchtige, niedermolekulare Substanzen nachgewiesen. Erste Untersuchungen an diesen biologischen Substraten führten über Konzentrierungsmethoden wie Extraktion (1) oder Anreicherung aus dem Kopfraum (2) meist unter Adsorption an hydrophobe Adsorbentien wie Tenax GC (3,4,5) durch die Methode der gekoppelten Gaschromatographie-Massenspektrometrie zur Identifizierung dieser Substanzen. Neben primären Alkoholen, Aldehyden und Ketonen wurden Heterocyclen wie Pyrrole und Furane aber auch schwefelhaltige Verbindungen nachgewiesen. Vergleichende Profilstudien, die mit Urin von Patienten und gesunden Personen unter normierten Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten, daß primäre Alkohole und aliphatische Ketone bei Patienten mit Diabetes mellitus regelmäßig vermehrt auftreten (6,7). Bisher ist für keine dieser Substanzen ein Stoffwechselweg bekannt. Eine Ausnahme bildet das Aceton, das durch spontane Decarboxylierung aus Acetoessigsäure, dessen Stoffwechselbedeutung hinreichend bekannt ist, entsteht. Bei der diabetischen Stoffwechseldekompensation - dem ketoacidotischen Koma - wird diese Substanz als Folge vermehrter Lipolyse und gestörter Endoxidation vermehrt gebildet. Für die klinisch chemische Diagnostik wäre es von hohem Interesse, wenn für die neu entdeckten Substanzen eine ähnliche oder noch spezifischere Indikatorfunktion - wie sie die Ketogenese bildet - gefunden werden könnte. Die Korrelation der Heptanon-4 Ausscheidung zu anderen klinischen und Stoffwechselparametern soll besonders unter Beachtung pathologischer Stoffwechselsituationen einen Beitrag zur Aufklärung der Funktion des Heptanon-4 im Stoffwechsel leisten. Als Grundlage dazu wird in dieser Arbeit eine quantitative Methode zur Bestimmung von Heptanon-4 und Heptanon-2 in Urinproben ausgearbeitet. Modifiziert kann diese Methode auch zumindest zur Bestimmung von erhöhten Heptanon-4 Spiegeln im Serum eingesetzt werden.

Als Methode zur effizienten Auftrennung komplexer Lösungen wird auch in dieser Arbeit die Gaschromatographie angewendet. Da die Zusammensetzung biologischer Substrate wechselt, besteht neben dem Problem der Auftrennung die Forderung nach gleichzeitiger, sicherer Identifizierung der zu messenden Substanz. Diese Forderung wird durch die in der Gaschromatographie gebräuchlichen Detektoren nur selten erfüllt, da nur für wenige Stoffklassen spezifische Detektoren existieren. Eine spezielle Technik der gekoppelten Gaschromatographie - Massenspektrometrie, die Massenfragmentographie, löst dieses Problem für viele Substanzen - auch für die untersuchten Heptanone (2,3,8). Dazu wird das Massenspektrometer auf ein (Single Ion Detection: SID) oder mehrere (Multiple Ion Detection: MID) für die Substanz möglichst charakteristische Fragmente fokussiert und somit als massenspezifischer Detektor des Gaschromatographen benutzt.

Das eigentliche methodische Problem bestand zunächst darin, die zu untersuchende Substanz aus dem biologischen Substrat in eine für die Gaschromatographie geeignete Form zu überführen. Die Messungen wurden dann in SID mit Fokussierung auf den Molekularpeak der Heptanone (m/e = 114) durchgeführt.

Da bisher kein anderes Massenspektrometer vom Typ CH 5 mit einer Einrichtung zur MID ausgerüstet war, werden im Methodenteil einige Kontrollexperimente für ihren Einsatz bei quantitativen Bestimmungen beschrieben.

C. METHODEN

1. Apparative Ausstattung und Chemikalien

1.1. Gaschromatographen

Zur Bestimmung der Trennbedingungen und zur Testung der Chromatographiesäulen wurde ein mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstetes Gerät - Modell 900 - der Firma Perkin-Elmer/Überlingen verwendet. Zur Probenaufbereitung nach dem Verfahren der Kopfraumanalyse stand ein Perkin-Elmer Gaschromatograph F 20 zur Verfügung. Frontplatte und Ofenisolation dieses Geräts wurden mit einer 5 mm Bohrung versehen, um einen Ausgang für die Kapillare zur Kopfraumextraktion zu erhalten (C.7.2.2.).

1.2. Gekoppeltes Gaschromatographie-Massenspektrometrie-System

Die Messungen wurden mit einem GC-MS System, bestehend aus einem Gaschromatographen Modell 2700 der Firma Varian und einem Massenspektrometer Typ CH 5 der Firma Varian MAT/Bremen, durchgeführt. Als Kopplungsteil diente eine Platinkapillare (30 cm Länge, 0,1 mm i.D.). Eine Hochleistungsdiffusionspumpe (Pumpleistung 600 l/sec) ermöglichte es, den gesamten Säulendurchfluß in die Ionenquelle einzuleiten. Das Massenspektrometer war mit folgenden Zusatzeinheiten ausgerüstet:

a) Mit einer 4-Kanal MID Einheit zur Simultanbestimmung von maximal 4 Massenfragmenten während eines Chromatographielaufs. Ihre Verwendung wird unter C.6. beschrieben.
b) Einer "Peak Match"-Einheit, die zur Auflösungsbestimmung benutzt wurde.

c) Einem Kleincomputer Spectrosystem 620L/100 der Firma Varian Data Machines zur Aufnahme und Auswertung von Massenspektren.

Als Detektionssystem diente bei der Massenfragmentographie der Sekundärelektronenvervielfacher des Massenspektrometers. Gaschromatogramme wurden über die Druckmeßionenquelle aufgenommen.

1.3. Registriergeräte

1.3.1. Kompensationsschreiber

Gaschromatogramme und Massenfragmentogramme wurden mit einem 2-Kanal-Kompensationsschreiber Modell 56 der Firma Perkin-Elmer/Überlingen registriert. Neben einer Nullpunktsanzeige war jeder Kanal mit einem Meßbereichsschalter ausgestattet, der eine Variation des Vollausschlagsignals von 1 mV - 1 V erlaubte.

1.3.2. Registrierung von Massenspektren

Die Massenspektren wurden entweder direkt mit einem Mehrkanalgalvanometerschreiber Typ Oscillofil der Firma Varian/Bremen aufgenommen oder nach Auswertung mit dem Computer über einen Complot-Plotter der Firma Houston Instruments/Bellaire, Texas, USA, registriert.

1.4. Chemikalien

Standardsubstanzen:

Substanz	Firma	Reinheitsgrad
Heptanon-2	Ega Chemie	98 %
Heptanon-3	"	98 %
Heptanon-4	"	99 %
Dioxan	Merck	99 %
Pentanon-2	"	99 %
Cyclohexanon	"	99 %

Die angegebenen Reinheitsgrade sind die vom Hersteller gaschromatographisch kontrollierten Mindestreinheitsgrade.

Lösungs- und Extraktionsmittel:

Cyclohexan	Merck	p.a.
Methanol	"	p.a.
Isopropylchlorid	Fluka	reinst
Triton X-100	Serva	

Weitere Lösungsmittel im Reinheitsgrad p.a. stammten von Merck.

Trennphase und Adsorbens:

Emulphor ON 870	Supelco, Bellefonte Pa. USA
Tenax GC (35-61 mesh)	Applied Science Laboratories Inc. State College, Pa. USA (über Serva bezogen)

Derivatisierungsreagenz:

Bortrifluorid-Methanolkomplex (20 %ig)	Merck-Schuchardt

Proteinfällungsreagentien und weitere Referenzsubstanzen wurden von Merck oder Merck-Schuchardt im Reinheitsgrad p.a. bezogen.

2. Belegung der Trennkapillaren

Die Stahlkapillarsäulen (100 m x 0,5 mm i.D.) wurden über eine Vorsäule (1,0 m x 0,75 mm i.D.) mit einem druckfesten Lösungsmittelreservoir verbunden. Zur Reinigung wurde mit komprimiertem Stickstoff Lösungsmittel durch die Säule getrieben. Um während der Belegung einen konstanten Strömungswiderstand zu garantieren, wurde eine zweite Säule nachgeschaltet. In der Regel wurden die Säulen der Reihe nach mit Chloroform, Aceton, Methanol und wieder mit Aceton und Chloroform, je ca. 30 ml, gespült. Bei neuen oder stark verschmutzten Säulen wurde dieses Schema modifiziert. Im Anschluß an Methanol wurde mit Wasser, mit 10 ml eines Säuregemischs (Essigsäure/HNO_3/H_2O, 1/1/1, 1:10 mit Wasser verdünnt), mit Wasser neutral gewaschen und weiter mit Methanol nach obigem Schema verfahren. Anschließend wurden die Säulen im Stickstoffstrom getrocknet und mittels Reduzierventil ein Durchfluß von 120-150 Blasen/min eingestellt. Die Imprägnierung erfolgte mit 5 ml einer 10 %igen Emulphorlösung in Chloroform. Nach Erscheinen der überschüssigen Lösung wurden die Kapillaren für 3 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit Temperaturprogramm von 30° - 175°C mit 0,5°C/min mindestens 12 h bei Endtemperatur ausgeheizt.

Die Güte der Trennsäule wurde qualitativ an Peakform und Retentionszeit nach isothermer Chromatographie eines Keton-Alkohol Testgemischs bei 80°C beurteilt.

3. Herstellung von Eich- und Standardlösungen

3.1. Stammlösungen

Die konzentrierten Stammlösungen wurden in bei 180°C ausgeheizten 100 ml Meßkolben angesetzt. Von den Standardsubstanzen wurden ca. 75-100 mg auf 0,1 % genau eingewogen und für die Extraktionsmethode mit 0,1 Vol%iger, wässriger (aqua bidest.) Triton X-100 Lösung sorgfältig gelöst. Aufbewahrt wurden die konzentrierten Stammlösungen sowie alle anderen Lösungen gasdicht verschlossen bei 4°C.

Für Direktinjektion und Kopfraumanalyse wurden Stammlösungen sowie die entsprechenden Verdünnungen auf wässriger Basis oder mit organischen Lösungsmitteln angesetzt.

Eichlösungen wurden in ausgeheizten 25 ml durch Verdünnen mit 0,1 Vol%iger Triton X-100 Lösung hergestellt.

Innere Standardlösung wurde durch 1:250 Verdünnung von Heptanon-3 Stammlösung mit 0,1 Vol%iger Triton X-100 Lösung hergestellt.

3.2. Lösungen für die Messung

Beim Extraktionsverfahren wurden zu 4 ml aqua bidest. in einem 8 ml Zentrifugenröhrchen mit NS 14 Schliff 200 µl der jeweiligen Eichlösung pipettiert, gemischt und extrahiert.

Für die Kopfraumanalyse wurde zu 1 ml aqua bidest. 50 µl Eichlösung pipettiert und aufgearbeitet.

Für die Direktinjektion wurde das Wasser durch 1 ml des jeweiligen Lösungsmittels ersetzt.

Für die Ketonbestimmung wurden die entsprechenden Was-

servolumina durch Urin ersetzt und 200 µl bzw. 50 µl innerer Standard dazupipettiert. Die durch das Volumen des inneren Standards verursachte Verdünnung wurde bei der Auswertung durch einen Korrekturfaktor von 1,05 berücksichtigt.

4. Vorbereitung des GC-MS Systems für die Massenfragmentographie und Wartung

Nach einer Anlaufzeit von 30 min war in der Regel der Arbeitsdruck von 5×10^{-5} torr und die Konstanz der Basislinie erreicht. Nach Einlaß von Referenzsubstanz in die Ionenquelle wurde der Magnetstromregler auf das untersuchte Fragment eingestellt, durch Fokussieren das Signal optimiert und die Auflösung überprüft. Um von Netz-bedingten Schwankungen möglichst unabhängig zu sein, wurde das Spaltsystem so eingestellt, daß ein trapezförmiges Signal auf dem Monitor erschien. Etwa alle 4 h wurde mittels Referenzsubstanz die Einstellung des Magnetstromreglers und die Fokussierung kontrolliert.

Bei Nachlassen der Auflösung wurde über Nacht die Ionenquelle ausgeheizt.

In Tabelle 1 sind die Meßbedingungen zusammengefaßt. Abweichungen bei einzelnen Versuchen werden vermerkt.

Tabelle 1: Geräteparameter für die Massenfragmentographie

Massenspektrometer	
Elektronenenergie der Druckmeßionenquelle	20 eV
Emissionsstrom der Druckmeßionenquelle	200 µA
Elektronenenergie der Ionenquelle	70 eV
Emissionsstrom der Ionenquelle	300 µA
Beschleunigungs-spannung	3 kV
Spannung des Sekundärelektronenvervielfachers	3 kV
Ionenquellen-temperatur	220°C
Interfacetemperatur	200°C
Auflösung	400
Arbeitsdruck	5×10^{-5} torr
Verstärker-einstellung	BDF 0,1

Gaschromatograph	
Ofentemperatur	80°C
Injektorblock	150°C
Durchfluß ca.	4,5 ml He/min

5. Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme

5.1. Registrieren der Chromatogramme

Mittels des Meßbereichsschalters des Kompensationsschreibers wurde der Meßbereich so eingestellt, daß jeweils die Höhe des Fragmentpeaks vollständig registriert wurde. Um bei einer notwendigen Änderung des Meßbereichs auch den Fußpunkt des Peaks abschätzen zu können, wurden kontinuierlich Marken für die Basislinie bei den entsprechenden Meßbereichen gesetzt.

5.2. Auswertung der Chromatogramme

Die quantitative Bestimmung erfolgte mit einer relativen Höhenmethode (9). Die Höhen wurden zwischen dem Schnittpunkt der Verbindungslinie beider Bandenfußpunkte mit dem Lot vom Bandengipfel auf die Zeitachse und dem Bandengipfel auf O,5 mm genau gemessen. Bei Flankenpeaks wurde eine entsprechende Tangente als Basis gewählt. Wurden Substanzpeaks und innerer Standard mit verschiedenen Meßbereichen registriert, wurden die ausgemessenen Höhen durch den entsprechenden Dämpfungsfaktor korrigiert. Über die relative Signalhöhe Δ (Quotient aus Substanzpeakhöhe und Peakhöhe des inneren Standards) wurde die Konzentration und 24 h-Ausscheidung der Ketone berechnet.

$$\text{Ketonmenge (in } 10^{-7} \text{ g/24 h)} = e \times \Delta \times V$$

e ist der aus den Eichkurven ermittelte Eichfaktor, V das Volumen des 24 h Sammelurins.

5.3. Berechnung des Eichfaktors e

Zunächst wurde für jede Messung mit einer Eichlösung der Auswertefaktor f berechnet.

$$f = \frac{\text{Peakhöhe innerer Standard x Konzentration Substanz}}{\text{Konzentration innerer Standard x Peakhöhe Substanz}}$$

Wurden bei einer Substanzkonzentration Mehrfachmessungen durchgeführt, so wurde ein Mittelwert $\bar{f} \equiv \bar{x}$ nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{1}^{n} x_i \qquad (10)$$

und die Standardabweichung mit einem HP 55 Taschenrechner der Firma Hewlett-Packard berechnet.

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma x_i^2 - \frac{\Sigma x_i^2}{n}}{n-1}} \qquad (10)$$

n ist der Stichprobenumfang.

Mit diesen Werten wurde ein Ausreißertest nach Nalimov durchgeführt. Berechnet wird die Größe r^*.

$$r^* = \frac{x^x - \bar{x}}{s} \sqrt{\frac{n}{n-1}} \qquad (11)$$

x^x ist der ausreißerverdächtige Wert.

Werte, für die gilt $r^* \geq r(99)$, wurden als signifikante Ausreißer eliminiert. r(99) wurde der r-Tabelle entnommen (11).

Die bei den einzelnen Substanzkonzentrationen gegebenenfalls gemittelten Auswertefaktoren $\bar{f}$ wurden nach der Mittelwertsformel zu einem $\bar{f}_{gesamt}$ zusammengefaßt und nach Nalimov auf Ausreißer überprüft. Mit dem so berechneten $\bar{f}_{gesamt}$ wurde der Eichfaktor nach folgender Formel berechnet.

$$e = \bar{f}_{gesamt} \times \text{Konzentration innerer Standard} \times 1{,}05$$

1,05 ist der Verdünnungskorrekturfaktor (C3.2.).

Mit der Standardabweichung verfügt man gleichzeitig über ein Maß für den Fehler des Eichfaktors. Außerdem wurde der Variationskoeffizient berechnet.

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \, 100 \text{ (in \%)}$$

In einigen Fällen wurde zusätzlich die Regressionsgerade mit folgenden Größen berechnet.

$$\text{Y - Achsenabschnitt } A = \frac{\Sigma y \, \Sigma x^2 - \Sigma x \, \Sigma xy}{n \, \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \qquad (10)$$

$$\text{Steigung} \qquad B = \frac{n \, \Sigma xy - \Sigma x \, \Sigma y}{n \, \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \qquad (10)$$

Aus der Größe B wurde ebenfalls der Eichfaktor berechnet.

$$e = \frac{1}{B} \times 1{,}05$$

Gleichzeitig wurde als Maß für die Linearität der Eichkurve mit dem in (10) angegebenen Programm der Korrelationsfaktor r_k berechnet.

5.4. t-Test

Zur Beurteilung und zum Vergleich von Mittelwerten wurden t-Tests durchgeführt und die Beurteilung entsprechend der Irrtumswahrscheinlichkeit vorgenommen.

$\alpha \leq 0{,}05$	wahrscheinlich verschieden
$\alpha \leq 0{,}01$	signifikant verschieden
$\alpha \leq 0{,}001$	hoch signifikant verschieden

Die Berechnung der Prüfgröße τ erfolgte nach (11)

$$\tau = \frac{|x_1 - x_2|}{s_d} \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}} \qquad (11)$$

mit

$$s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Die entsprechenden τ-Werte wurden mit einer t-Tabelle (12) bestimmt.

6. Anwendung der MID-Einheit im Massenspektrometer CH 5

6.1. Funktionsprinzip der MID-Einheit

Das Funktionsprinzip der MID-Einheit läßt sich aus der Abbildungsbedingung einfach fokussierender Massenspektrometer ablesen

$$\frac{m}{Q} = \frac{B^2 R^2}{2 U_B} \qquad (13)$$

mit: U_B: Beschleunigungsspannung; m/Q: reziproke spezifische Fragmentladung; B: Magnetische Induktion; R: Bahnradius des Fragments (durch Apparategeometrie festgelegt).

Im Massenspektrometer vom Typ CH 5 arbeitet die MID-Einheit bei konstantem Magnetfeld. Durch Variation von U_B lassen sich bei sonst gleichen Parametern verschiedene m/Q messen (Formel s.o.). Über 4 Kanäle können verschiedene Werte von U_B eingestellt werden und für bestimmte, im Bereich von 10 msec - 10 sec wählbare Zeiten, alternierend auf den einzelnen Kanälen die zugehörigen Fragmente gemessen werden. Jeder Kanal ist mit einem "sample and hold" Integrator ausgestattet, der das Signal während der Meßperiode aufnimmt und bis zur nächsten Meßperiode auf dem Endwert stehen bleibt. Registriert werden diese stufenförmigen Signale mit einem Kompensationsschreiber.

6.2. Funktionskontrolle der MID Einheit im MS CH 5

6.2.1. Einfluß der Beschleunigungsspannung auf die Signalgröße

Gemessen wird in diesem Versuch die Signalhöhe H (Abb. 2), die bei Änderung der Beschleunigungsspannung durch deren Einfluß auf die Ionenstrahlgeometrie verändert wird. Registriert wurden die Signale mit dem Galvanometerschreiber, die Beschleunigungsspannung am Ausgang J149 des Hochspannungseinschubs in Bruchteilen von 10 V (10 V = 3 kV)

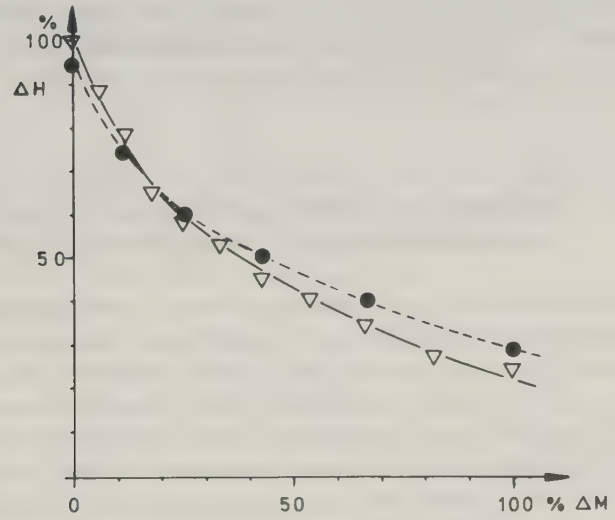

Abb. 1: Einfluß der Beschleunigungsspannung auf die Signalhöhe. Gemessen wurde das Fragment m/e = 119 von Perfluorkerosin. ΔH ist die relative Signalhöhe bezogen auf Fokussierung bei 3 kV und U_B = 3 kV. ΔM ist der prozentuale Massenunterschied der Fragmente, berechnet aus

$$\Delta M = \frac{M_{U_{BX}}}{M_{U_{B\,3kV}}} \times 100 = \left(\frac{U_{B\,3kV}}{U_{BX}} - 1\right) \times 100.$$

△———△ Fokussierung bei 3 kV
●------● Fokussierung bei 2,25 kV

mit einem Digitalvoltmeter gemessen+. Zunächst wurde das Signal eines Referenzfragments bei U_B = 3 kV durch sorgfältiges Fokussieren optimiert und U_B in Schritten von 150 V bis U_B = 1,5 kV über das Potentiometer eines MID Kanals variiert. Durch Verändern der Magnetfeldstärke wurde jeweils das Signal aufgesucht und registriert. Nach Fokussieren des Signals bei 2,25 kV wurde der Versuch wiederholt.

Eine Verringerung der Beschleunigungsspannung U_B führt bei konstanter Fokussierung zu einer schnellen Abnahme der Signalhöhe (Abb. 1). Dies entspricht bei gleicher Verstärkung einer verringerten Nachweisempfindlichkeit. Durch Fokussieren auf das schwerere Fragment, hier simuliert durch Fokussieren bei 2,25 kV, läßt sich bei extremen Massendifferenzen (> 50 %) bis zu 20 % an Empfindlichkeit gegenüber Fokussierung auf das Basissignal bei 3 kV gewinnen.

6.2.2. Bestimmung der Trägheit der Hochspannungseinstellung bei Änderung der Beschleunigungsspannung

Zur Bestimmung der Zeitdauer für die Umladungsvorgänge im gesamten Hochspannungssystem wurde die Beschleunigungsspannung über 2 Kanäle der MID Einheit variiert und die Signale mit dem Galvanometerschreiber aufgezeichnet. Ein Kanal der MID Einheit wurde bei U_B = 3 kV auf den Molekülpeak von Cyclohexan m/e = 84,16 eingestellt und über einen zweiten Kanal wurden sukzessive andere, bekannte Fragmente im Bereich von m/e = 86 - 131 aufgesucht. Bei jedem Spannungspaar wurden die Signale für ca. 1 sec bei einem Papiervorschub von 125 cm/sec registriert und die mittleren Signalgruppen zur Auswertung verwendet. Die Meßdauer auf jedem Kanal betrug 100 msec.

+ Dieser Versuch wurde zusammen mit Herrn Poganatz von der Firma Varian MAT/Bremen durchgeführt.

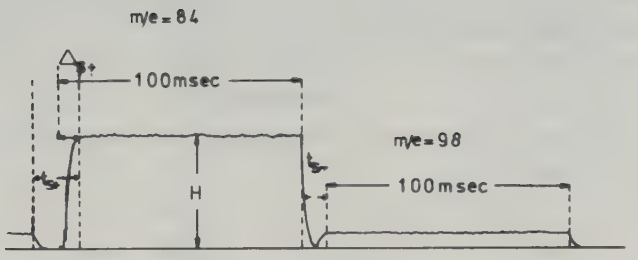

Abb. 2: Meßgrößen in Versuch 6.2.1. und 6.2.2. H ist die Signalgröße. t_s ist der Abstand zweier Signale, bei negativer Änderung von U_B: t_{s-} , bei positiver Änderung: t_{s+}. Δ_s ist die Abweichung von der Solldauer (100 msec) des Plateausignals, bei positiver Änderung von U_B: Δ_{s+}, bei negativer Änderung: Δ_{s-}. Im dargestellten Fall ist $\Delta_{s-} = 0$.

Ausgemessen wurde der Abstand zweier aufeinanderfolgender Signale t_s und die Abweichung Δ_s von der Sollplateaudauer, die entsprechend dem Papiervorschub 125 cm ≙ 100 msec ist. Abb. 3a zeigt, daß der Abstand zweier Signale außer von der Größe der Spannungsänderung auch von ihrer Richtung abhängig ist. Die Umladungsvorgänge beim Einstellen auf eine kleinere Beschleunigungsspannung (d.h. Messung des schwereren Fragments) laufen schneller ab als die Umladungsvorgänge beim Rücksprung auf den Ausgangswert von U_B. Aus der in Abb. 3b dargestellten Abhängigkeit der Plateausignaldauer von der Beschleunigungsspannung läßt sich die minimale Meßdauer ablesen, die notwendig ist, um das Signal bei entsprechender Größe der Massenänderung unverfälscht zu registrieren. Auch hier zeigt sich eine unterschiedliche Trägheit für positive und negative Änderungen der Beschleunigungsspannung.

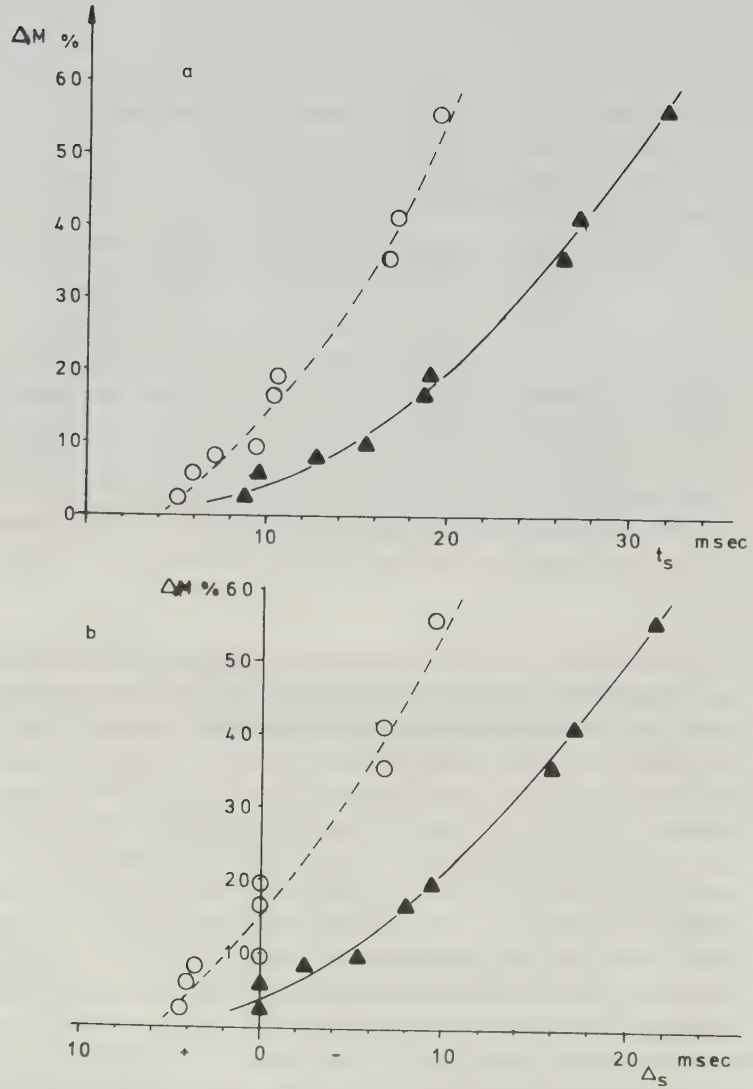

Abb. 3a und b: Bestimmung der Trägheit des Hochspannungssystems. Als Ordinate wurde wegen der Praktikabilität bei der späteren Anwendung die relative Massenänderung aufgetragen. Es gilt:

$$\Delta M = \frac{M3kV}{Mx} \times 100 = \left(\frac{Ux}{U3kV} - 1\right) \times 100$$

3a) o-----o t_{s-} ▲——▲ t_{s+}

3b) o-----o Δ_{s-} ▲——▲ Δ_{s+}

Für die Messung ergeben sich folgende Regeln:

1. Meßdauer 10 msec: Anwendbar bei positiver Spannungsänderung für bis zu 20 % bei negativer Änderung für bis 50 % unterschiedene Massenfragmente.

   Meßdauer 30 msec: Einschränkung bei positiver Spannungsänderung ab 85 % unterschiedenen Fragmentmassen. (Wert aus Abb. 3b geschätzt).

2. Bei Verwendung mehrerer Kanäle, z.B. bei der simultanen Registrierung der Massenfragmente m/e = 84, 98, 114, 131, empfiehlt sich folgende Anordnung:

Kanal	1	2	3	4
Fragment m/e	84	131	114	98

   Auf diese Art wird der langsamste Schaltvorgang U_B (m/e = 131) nach U_B (m/e = 84) in mehrere, schnellere Teilschritte zerlegt. Dadurch ist unter Umständen die Verwendung einer kürzeren Meßdauer und eine weniger verzerrte Darstellung der Fragmentogramme möglich.

6.3. Anwendung der MID Einheit bei quantitativen Bestimmungen

Um die Anwendbarkeit der MID Einheiten für die quantitative Bestimmung zu prüfen, wurde eine Eichkurve für die simultane, quantitative Bestimmung von Pentanon-2 und Cyclohexanon mit Dioxan als innerem Standard aufgenommen. Die Eichkurve wurde durch Direktinjektion von Isopropyleichlösungen gewonnen.

Tab. 2: MID Parameter für die Eichkurvenbestimmung

Substanz	Pentanon-2	Cyclohexanon	Dioxan
Kanal	1	2	3
Fragment m/e	86	98	88
Verstärkung	1,0	1,0	1,0
Dämpfung	0,1	0,1	0,1
Meßdauer (msec)	0,1	0,1	0,1

Übrige Parameter siehe Tab. 1 (C.4.).

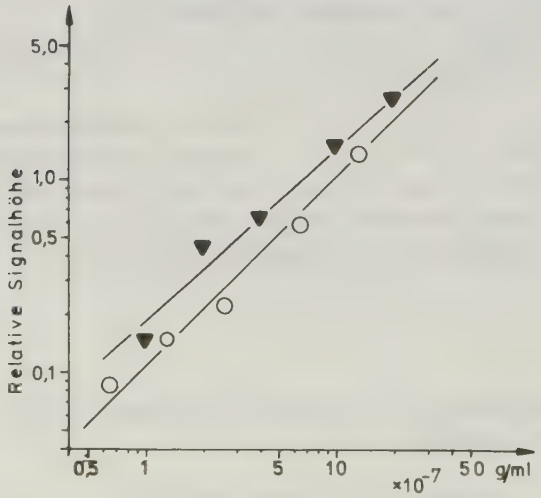

Abb. 4: Eichkurve für Pentanon-2 und Cyclohexanon. Innere Standardkonzentration Dioxan 3,73 x 10^{-7} g/ml.

▼———▼ Pentanon-2, O———O Cyclohexanon

Ein Vergleich der durch MID Technik erhaltenen Eichkurven (Abb. 4) mit den durch SID Technik bestimmten Eichkurven findet sich in der Diskussion (E.1.). Eine Simultanbe-

stimmung von Cyclohexanon und den Heptanonen scheiterte an Verunreinigungen im Cyclohexan. Nach längerem Luftkontakt bilden sich wahrscheinlich Oxidationsprodukte des Cyclohexans, unter anderen auch Cyclohexanon.

6.4. Anwendung der MID Einheit bei der Zuordnung von Fragmenten zu gaschromatographischen Banden

Bei sehr kleinen Substanzmengen ist es oft unmöglich, ein aussagekräftiges Massenspektrum aufzunehmen. Doch ist es mit der MID Einheit möglich, interessierende Fragmente zu registrieren und mit dem gleichzeitig über die Druckmeß-ionenquelle aufgenommenen Gaschromatogramm zu vergleichen. Auf diese Art ist unter Umständen eine Identifizierung der gaschromatographischen Bande möglich. Diese Methode wurde bei der Suche nach dem Veresterungsprodukt des Heptanon-4-Vorläufers angewendet (D.2.3.).

7. Methoden zur quantitativen Bestimmung von Heptanon-4 und Heptanon-2 in Urin und Serum

7.1. Direkte Injektion wässriger Probenlösungen

Als einfachstes Verfahren zur Bestimmung der Heptanone wurde die direkte Injektion von wässrigen Lösungen und Urinproben in Mengen von 0,5 µl versucht. Variiert wurden die Geräteparameter mit dem Ziel der optimalen Einstellung und die in SID Fragmentographie beobachteten Fragmente m/e = 43, 71 und 114 auf ihre Eignung für die Bestimmung untersucht.

7.2. Quantitative Bestimmung der Heptanone mittels Kopfraumanalyse mit zwischengeschalteter Adsorption als Methode zur Konzentrierung

7.2.1. Adsorptionsröhrchen

Schmelzpunktröhrchen mit einem mittleren Durchmesser von 1,5 mm und einer Länge von 10 cm wurden an einer Seite mit einem Glaswollpfropf versehen und sorgfältig mit Chromschwefelsäure gereinigt. Nach Spülen mit Wasser und Methanol wurden die Röhrchen über Nacht mit 5 Vol%iger Dimethyldichlorsilanlösung in Toluol silanisiert und anschließend mit Methanol gewaschen. Dann wurden die Röhrchen bis zu einer Packungshöhe von 5-6 cm mit ca. 7-10 mg Tenax GC gefüllt und die Füllung durch einen zweiten Glaswollpfropf gestützt. Vor der Verwendung wurden die Röhrchen für 30 min bei 350°C im Stickstoffstrom von adsorbierten Substanzen befreit und anschließend in ausgeheizten Glasröhrchen mit dichtem Verschluß aufbewahrt. Die Adsorptionsröhrchen wurden mehrfach verwendet und jeweils durch Ausheizen im Stickstoffstrom regeneriert.

7.2.2. System zur Durchführung der Kopfraumanalyse

An den Injektor des F20 Gaschromatographen wurde über ein einseitig ausgezogenes Stück Glassäule ein Teflonschlauch (Länge 1 m, 1,5 mm i.D.) gezogen. Durch ein Führungsrohr in der Bohrung (C.1.1.) wurde das Ende des Teflonschlauchs aus dem Ofenraum geführt. Dieses Ende wurde so weit gedehnt, daß die Adsorptionsröhrchen leicht angeschlossen werden konnten. Mit den Parametern Stickstoffdurchfluß, Ofentemperatur und Sammeldauer konnte die Adsorption beeinflußt werden.

7.2.3. Probenaufbereitung und Transfer in das Chromatographiesystem

Nach Erreichen der Adsorptionsbedingungen wurde das Adsorptionsröhrchen mit dem Teflonschlauch verbunden. Nach Injektion von 5 µl Probenlösung wurde die Adsorptionsdauer genau mit einer Stoppuhr gemessen. Das Wasser kondensierte während der Sammeldauer in feinen Tropfen vor dem Adsorptionsröhrchen in der Teflonkapillare. Gleich nach Ende der Sammelperiode wurde das Adsorptionsröhrchen in den Desorber (C.7.2.4.) des GC-MS Systems transferiert. Während der Sammelperiode wurde die Vorsäule (C.2.) mit flüssiger Luft vorgekühlt, so daß die bei 300°C desorbierten Substanzen in scharfer Front kondensiert wurden. Nach einer Desorptionsdauer von 3 min wurde das Kühlgefäß entfernt und durch Aufheizen des Gaschromatographen mit der Trennung begonnen. Das Adsorptionssystem wurde durch 10 minütiges Ausheizen bei 150°C der in den Ofen zurückgezogenen Teflonkapillare regeneriert.

7.2.4. Desorber zur schnellen Probeneinführung

Wegen der schnell einsetzenden Desorption der Substanzen vom Tenax wurde ein Injektorblock so modifiziert, daß die Probenröhrchen innerhalb von 1 sec in das Trennsystem eingebracht und dieses gasdicht verschlossen werden konnte (Abb. 5). Diese Zeitspanne ist ungefähr 10 mal kürzer als die zum Erreichen der Desorptionstemperatur von 300°C notwendige Zeit.

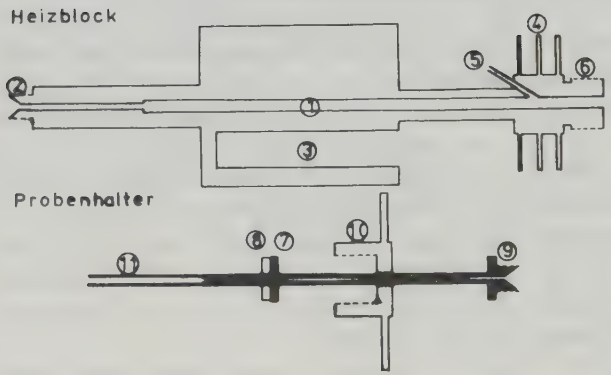

Abb. 5: Desorber zur schnellen Probeneinführung. 1 Desorptionsraum, 2 Säulenanschluß, 3 Bohrung für das Heizelement, 4 Wärmeableitbleche, 5 Zusatzgaseinlaß, 6 Montagegewinde für den Probenhalter, 7 Druckplatte, 8 Silikongummidichtung, 9 Hauptträgergasanschluß, 10 Überwurfmutter, 11 Adapter für das Adsorptionsröhrchen. Der Gasanschluß 9 erfolgte über eine locker gewickelte 1 m lange Stahlkapillare. Dies ermöglichte die nötige Bewegungsfreiheit für den Probenhalter.

7.2.5. Bestimmung einer Adsorptionskinetik

Zur Bestimmung der optimalen Adsorptionsparameter wurde der Einfluß von Ofentemperatur, Trägergasfluß und Sammeldauer bestimmt. Dazu wurden 5 µl Probenlösung unter verschiedenen Bedingungen aufgearbeitet und chromatographiert (C.7.2.3.). Als Bezugswert (100 % Ausbeute) diente der 10-fache Integrationswert der Heptanon Signale, die durch direkte Injektion von 0,5 µl der gleichen Probenlösung erhalten wurde. Die Integration der Signale erfolgte bei diesem Versuch ausnahmsweise mit einem elektronischen Integrator Modell 485 der Firma Varian.

7.2.6. Bestimmung einer Eichkurve und der Reproduzierbarkeit für die Heptanonbestimmung mit der Kopfraummethode

Die Eichlösungen mit einer Heptanon-4 bzw. Heptanon-2 Konzentration zwischen 7,5 x 10^{-8} und 4,6 x 10^{-7} g/ml wurden entsprechend C.3. hergestellt. Die Konzentration des inneren Standards betrug 1,5 x 10^{-7} g/ml. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurde ein Eichpunkt 5-fach gemessen. Bei der Aufarbeitung wurden folgende Bedingungen verwendet: Injektortemperatur: 170°C, Ofentemperatur 100°C, Stickstoffluß ca. 3 ml/min und Sammeldauer 4 min. Die gleichen Bedingungen wurden bei der Aufarbeitung der Urinproben benutzt.

7.3. Extraktionsmethode

7.3.1. Auswahl des Extraktionsmittels

Zur Kontrolle der Reinheit und Überprüfung der Eignung als Lösungsmittel wurden Fragmentogramme m/e = 114 von folgenden Lösungsmitteln gemessen:
Methylenchlorid, Chloroform, Hexan, Heptan und Cyclohexan. Jeweils 1 µl wurde chromatographiert.

7.3.2. Bestimmung der Extraktionsausbeute bei der Cyclohexanextraktion

Entsprechend C.3. wurden 2 verschiedene Standardlösungen mit Konzentrationen von 1,5 x 10^{-7} und 1,5 x 10^{-6} g/ml Heptanon-4 bzw. Heptanon-2 angesetzt. Die beiden Standardlösungen wurden jeweils in 5 verschiedenen Volumverhältnissen von 1:1 bis 10:1 (Standardlösung: Cyclohexan) mit Cyclo-

hexan extrahiert. Die Extraktion erfolgte durch 1 minütiges Schütteln und anschließende Zentrifugation - 10 min bei 1500 g - zur schnellen Phasentrennung. Von der oberen Phase (Cyclohexan) wurde ein Aliquot entnommen, innerer Standard (Heptanon-3) in Cyclohexan dazupipettiert und dann 1 µl chromatographiert. Die restliche Oberphase wurde abgesaugt, die Hälfte der Unterphase in ein zweites Extraktionsgefäß transferiert und jeweils im gleichen Volumverhältnis wie bei der ersten Extraktion mit Cyclohexan extrahiert. Nach Entnahme eines Aliquots der Cyclohexanphase und Zusatz von innerem Standard wurden auch diese Extrakte chromatographiert.

Da die Verteilungskoeffizienten der Heptanonisomeren im System Wasser - Cyclohexan nicht bekannt waren, wurde zur Auswertung eine Eichkurve durch Direktinjektion von 8 verschiedenen Konzentrationen der Heptanone in Cyclohexan hergestellt. Entsprechend C.5.3. wurden Eichfaktoren berechnet und die Heptanon-2 bzw. Heptanon-4 Konzentration bestimmt (C.5.2.). Die Eichfaktoren und ihre Genauigkeit werden in E.1. diskutiert.

7.3.3. Eichkurve für das Extraktionsverfahren und seine Reproduzierbarkeit

Zur Auswertung der Bestimmung von Heptanon-2 bzw. Heptanon-4 im Urin wurden Eichlösungen im Konzentrationsbereich von $7{,}6 \times 10^{-8}$ bis $1{,}5 \times 10^{-5}$ g/ml an Heptanon-2 bzw. Heptanon-4 mit Heptanon-3 ($1{,}56 \times 10^{-7}$ g/ml) als innerem Standard entsprechend C.3. hergestellt. Extrahiert wurden die Eichlösungen im Verhältnis 4:1 mit Cyclohexan entsprechend C.7.3.2. Die Auswertung ist in C.5.2. und C.5.3. beschrieben. Jeder Eichpunkt wurde doppelt bestimmt. Eine Abschätzung der Reproduzierbarkeit wurde durch 5-fach Bestimmung bei 3 Eichkonzentrationen vorgenommen.

7.3.4. Bestimmung der thermischen Degradationskinetik des Heptanon-4 Vorläufers

Zur Kontrolle der thermischen Bildung von Heptanon-4 wurde eine Kinetik aufgenommen. Dazu wurden Urinproben einer Normalperson bei 70°, 90° und 99°C im Wasserbad für verschieden lange Zeiten inkubiert und die Heptanon-4 Konzentration bestimmt.

7.3.5. Temperaturabhängigkeit der Degradationsreaktion

Im Temperaturbereich von 40° bis 99°C wurden Urinproben im Wasserbad für 30 min inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion durch Abkühlen in flüssiger Luft die Heptanon-4 Konzentration bestimmt.

7.3.6. Bestimmung der Heptanone im Urin und ihre Reproduzierbarkeit

Die Urinextraktion wurde nach C.7.3.2. mit 4 ml Urin und 1 ml Cyclohexan durchgeführt. Vor der Extraktion wurde zur Meßlösung 200 µl innerer Standard pipettiert (C.3.). Die Berechnung wurde mit den nach C.7.3.3. bestimmten Eichfaktoren entsprechend C.5.2. durchgeführt.

Bei 20 Patienten und Kontrollpersonen wurde das freie Heptanon-4 bzw. Heptanon-2 im Urin gemessen. Normalerweise wurde die Gesamtkonzentration nach Umwandlung des Heptanon-4 Vorläufers (C.7.3.4. und D.2.3.4.) bestimmt. Dazu wurden die Urinproben vor der Extraktion für 90 min bei 90°C in dicht verschlossenen Schliffgläsern inkubiert. Zum Ausschluß der ebenfalls möglichen Heptanon-3 Bildung wurden 20 so behandelte Proben ohne inneren Standard chromatographiert.

Urinproben von einem Diabetiker und einer Kontrollperson wurden 5-fach bestimmt und die Reproduzierbarkeit der Messung bestimmt.

7.3.7. Bestimmung der Beständigkeit von Standardlösungen, Extrakten und Urinproben

Zur Bestimmung der Beständigkeit von Standardlösungen wurden eine Eichlösung für Heptanon-4 ($3{,}02 \times 10^{-6}$ g/ml) und eine Heptanon-3 Standardlösung der gleichen Konzentration 8 Wochen verschlossen bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. Mit entsprechenden, frisch angesetzten Lösungen wurden dann gemäß C.3.2. die 4 möglichen Kombinationen von Meßlösungen hergestellt und jede 5-fach bestimmt. Die Mittelwerte der Auswertefaktoren (C.5.3.) wurden mittels t-Test (C.5.4.) beurteilt.

Zur Bestimmung der Extraktbeständigkeit wurden die unter C.7.3.6. 5-fach bestimmten Extrakte für 3 Tage bei $4^{\circ}C$ gelagert und erneut 5-fach bestimmt. Die Mittelwerte der relativen Signalhöhen wurden durch t-Test beurteilt.

Eine Urinprobe wurde für 4 Wochen eingefroren bei $-30^{\circ}C$ gelagert, dann aufgearbeitet und die Heptanon-4 Konzentration mit der einer sofort bestimmten Probe verglichen.

7.4. Methode zur Bestimmung von Heptanon-4 im Serum

Zur Bestimmung von Heptanon-4 im Serum wurden die Proteine gefällt und nach Zentrifugation der Überstand wie eine Urinprobe aufgearbeitet. Als Fällungsmittel wurden Lösungen von Perchlorsäure, Pikrinsäure, Uranylacetat und Trichloressigsäure getestet. Der Fällungsendpunkt wurde durch fraktionierte Fällung bestimmt. Bei der Konzentra-

tionsberechnung wurde der Anteil des Überstandes am Gesamtvolumen - Serumvolumen + Volumen des Fällungsreagenz - durch einen Korrekturfaktor berücksichtigt.

8. Versuche zur Identifizierung des Heptanon-4 Vorläufers

8.1. Versuch zur Ätherextraktion des Heptanon-4 Vorläufers

Ca. 1 l Urin wurde 3 mal mit je 50 ml Cyclohexan zur Entfernung des direkt extrahierbaren Heptanons vorextrahiert. Dann wurde mit 30 ml konzentrierter Salzsäure (32,5 Gew%) angesäuert und 5 mal mit je 300 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und für weitere Versuche mit dem Rotationsverdampfer eingeengt.

8.2. Versuch zur Derivatisierung und massenfragmentographischen Bestimmung des Heptanonvorläufers

Um den Heptanon-Vorläufer - hypothetisch eine β-Ketocarbonsäure - in eine chromatographierbare, beständigere Form zu überführen, wurde eine Veresterung mit Bortrifluorid-Methanolkomplex versucht (14). Der eingeengte Ätherextrakt wurde mit 5 ml 10 %iger Bortrifluorid-Methanollösung 30 min bei 50°C inkubiert. Nach Zersetzen des Reaktionskomplexes mit Wasser wurde das Reaktionsgemisch mit Isopropylchlorid extrahiert und der Extrakt chromatographiert (C.6.4.). Registriert wurden das Gaschromatogramm und das Fragment m/e = 172, der Molekularpeak des vermuteten Esters. Die Chromatographiebedingungen waren in diesem Fall: 16 min isotherm bei 120°C und programmiert mit 1°C/min bis 175°C.

9. Herkunft von Untersuchungsmaterial und klinischen Daten

Die Urinproben wurden als 24 h - Sammelurine im Rahmen der Stoffwechselüberwachung der Patienten während deren Klinikaufenthalt erhalten. Bei getrennter Sammlung von Tag- und Nachtportion betrug die Sammeldauer je 12 h und wurde in der Zeitdauer von 7^{00} - 19^{00} bzw. von 19^{00} - 7^{00} gewonnen. Zwischenzeitlich wurden die Urine auf den Stationen in abgedeckten Gefäßen im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die Stoffwechselparameter wie Uringlukose und Blutzucker wurden mit den etablierten Methoden des klinisch chemischen Labors im Rahmen der täglichen Routinekontrollen bestimmt.

Diese Werte wurden zusammen mit den Diagnosen und Therapieplänen den Krankengeschichten entnommen.

D. ERGEBNISSE

1. Verwendung von Detergentien für die Standardlösungen

Die Heptanone besitzen in Wasser zwar bei Zimmertemperatur eine Löslichkeit von ca. 4 g/l (15), doch läuft der Lösungsvorgang sehr langsam ab. Zur Vermeidung von Verlusten während des Lösungsvorgangs wurde dieser durch Zusatz von Detergentien beschleunigt. Triton X-100 erwies sich für die Extraktionsmethode als geeignet, da bei Chromatographie der Extrakte im Fragmentogramm m/e = 114 keine zusätzlichen Banden auftraten. Für die Kopfraumanalyse wurde das in seinem Adsorptionsverhalten an Tenax dem Wasser ähnelnde Methanol verwendet. Bei der Verdampfung im Injektor zersetzte sich Triton X-100 ebenso wie Natriumduodecylsulfat oder Desoxycholsäure und lieferte nach der Adsorptionsprozedur im Fragmentogramm störende Banden.

2. Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Heptanon-4 und Heptanon-2 im Urin

2.1. Ergebnisse durch die Methode der Direktinjektion wässriger Lösungen

Durch die Direktinjektion von Urinproben wurde der Meßbereich festgelegt (C.4.). Ein Vergleich der Fragmentogramme m/e = 114, 71 und 43 ergab für den Molekularpeak m/e = 114 die größte Spezifität. Da sich in diesem Fragmentogramm lediglich bei der entsprechenden Retentionzeit die Signale der Heptanone fanden, wurde dieses Fragment für die Messungen ausgewählt (Abb. 6).

Ein Vergleich der Signalhöhen von Heptanon-4 in Standardlösungen und Urinproben führte zu einem Schätzwert von

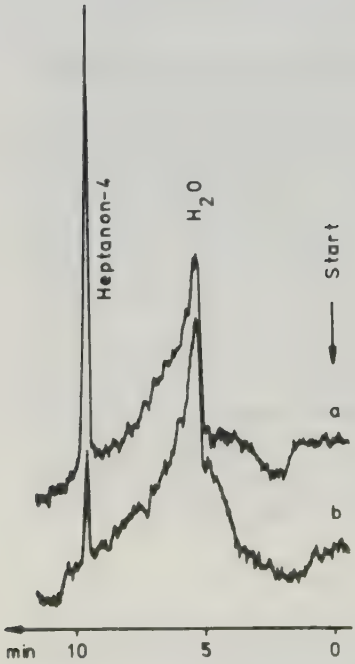

Abb. 6:
Fragmentogramm m/e = 114. Direktinjektion wässriger Lösungen.
a) 0,5 µl Heptanon-4 Standard 6,4 x 10^{-7} g/ml.
b) 0,5 µl Urinprobe.
Die große Wassermenge verursacht eine Druckänderung und wird daher im Fragmentogramm durch eine Verschiebung der Basislinie angezeigt.

1,5 x 10^{-7} g/ml für die Urinkonzentration von Heptanon-4 entsprechend einer täglichen Ausscheidung von 200 µg/24 h bei einem gesunden 29-jährigen. Da in den untersuchten Urinen kein Heptanon-3 gefunden wurde, wurde diese Substanz in einer Konzentration von 1,5 x 10^{-7} g/ml bei den weiteren Untersuchungen als innerer Standard benutzt.

Als Schwierigkeit erwies sich die Schädigung der Trennsäule durch die wässrigen Lösungen, durch die schon nach wenigen Chromatographieläufen die Trennleistung stark vermindert wurde. Daher mußten Verfahren zur Abtrennung der Heptanone vom Wasser versucht werden.

2.2. Ergebnisse durch Anreicherung der Heptanone mit einem Verfahren der Kopfraumanalyse

2.2.1. Adsorptionsausbeute

Unter geeigneten Bedingungen läßt sich innerhalb von 3-4 min bis zu 80 % des eingesetzten Heptanons aus dem Kopfraum durch Adsorption an Tenax zurückgewinnen (Abb. 7). Längere Sammeldauern scheinen wegen der abfallenden Tendenz des Plateauwertes nicht sinnvoll. Einzelversuche bei Ofentemperaturen unter 80°C und längeren Sammeldauern (> 30 min) und hohen Trägergasflüssen (> 15 ml/min) brachten unbefriedigende Ergebnisse mit weniger als 30 % Ausbeute.

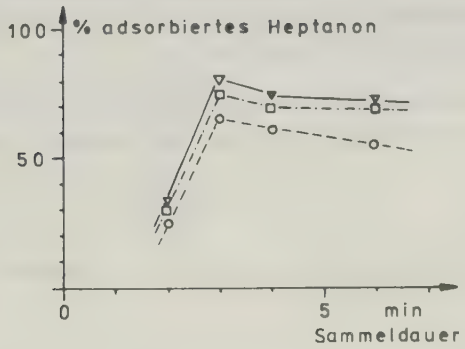

Abb. 7: Adsorptionskinetik
□-·-·-□ Heptanon-4
▽——▽ Heptanon-3
O----O Heptanon-2
Konzentration in der Eichlösung: Heptanon-4: 7,5 x 10^{-8} g/ml, Heptanon-3 und Heptanon-2 je 1,5 x 10^{-7} g/ml; Adsorptionsbedingungen: Ofentemperatur 100°C, Trägergasfluß ca. 3 ml N_2/min, Desorption bei 300°C 3 min.

2.2.2. Anwendung der Kopfraumanalyse zur Bestimmung der Heptanone im Urin

Mit den unter D.2.2.1. angegebenen Bedingungen wurde bei einer Sammeldauer von 4 min im Konzentrationsbereich von 0,8 - 4,5 x 10^{-7} g/ml eine Eichkurve für Heptanon-4 und Heptanon-2 aufgenommen. Für die Auswertung von Urinproben wurden Eichfaktoren sowie deren Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet (C.5.). Für die Heptanon-4 Bestimmung ergab sich ein Eichfaktor von 1,11 x 10^{-7} g/ml mit der Standardabweichung s = 0,05 x 10^{-7} g/ml und einem Variationskoeffizient v = 4,5 %; für Heptanon-2 war der Eichfaktor 2,89 x 10^{-7} g/ml und s = 0,25 x 10^{-7} g/ml sowie v = 8,7 %. Ein Vergleich mit den nach anderen Methoden ermittelten Eichfaktoren findet sich in E.1.

Abweichungen von der Linearität der Eichkurven traten nur bei der Heptanon-2 Eichgeraden im Konzentrationsbereich unterhalb von 1,0 x 10^{-7} g/ml auf.

Durch 5-fach Bestimmung eines Eichpunktes ergaben sich für die Reproduzierbarkeit der Methode folgende Werte (Tab. 3).

Tab. 3: Reproduzierbarkeit der Heptanonbestimmung mit der Methode der Kopfraumanalyse

Substanz	Konzentration	Standardabweichung	Variationskoeffizient
Heptanon-4	2,99x10^{-7}g/ml	0,06x10^{-7}g/ml	2,2 %
Heptanon-2	3,07x10^{-7}g/ml	0,11x10^{-7}g/ml	3,6 %

Abb. 8 zeigt, daß mit der beschriebenen Technik der Kopfraumanalyse eine Bestimmung der Heptanone möglich ist. Doch ergaben sich unter Routinebedingungen immer wieder ernst-

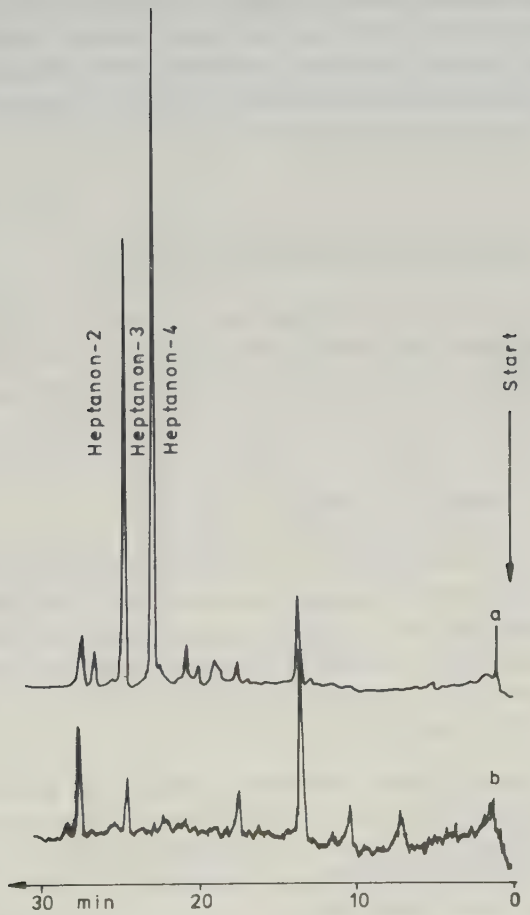

Abb. 8: Fragmentogramm m/e = 114. Heptanon-4 Bestimmung mit der Kopfraumanalyse.
a) Meßprotokoll eines 24 h Urins eines Kontrollpatienten. Schreiberempfindlichkeit 10 mV, Heptanon-4 ca. 200 µg/24 h, Heptanon-2 26 µg/24 h.
b) Leerwert, analoge Aufarbeitung von 5 µl aqua bidest. Schreiberempfindlichkeit 5 mV.

hafte Schwierigkeiten durch Verunreinigungen (Abb. 8b). Besonders Banden neben dem Heptanon-2 und beim Heptanon-3-Signal führen zu Fehlmessungen. Eine Ermittlung der Verunreinigungsquelle erwies sich im komplexen Meßsystem als schwierig. Mögliche Ursachen liegen sowohl in einer thermischen Instabilität von Tenax bei 300°C als auch in Kontaminationen der gaszuführenden Systeme im Adsorptions- oder Chromatographiesystem.

2.3. Ergebnisse der Extraktionsmethode

Als eine weitere Methode zur Anreicherung und Abtrennung der Heptanone vom Wasser wurde die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln versucht.

2.3.1. Extraktionsausbeute

Von den untersuchten Lösungsmitteln entsprach Cyclohexan mit einer geeigneten Retentionszeit und einem leeren Fragmentogramm m/e = 114 den gaschromatographischen Voraussetzungen. Seine Eignung als Extraktionsmittel wurde bei 2 Konzentrationen der Heptanone je ca. $1,5 \times 10^{-7}$ bzw. $1,5 \times 10^{-6}$ g/ml getestet.

Bei beiden Konzentrationen schwankt die Ausbeute für Heptanon-4 und Heptanon-2 bei einem Extraktionsverhältnis von 1:1 bis 5:1 (wässriger Standard:Cyclohexan) zwischen 90 und 100 % (Abb. 9). Beim Volumverhältnis von 10:1 werden wahrscheinlich auf Grund der schlechteren Durchmischung bei der kurzen Extraktionsdauer (C.7.3.2.) die Ausbeuten mit 80 - 90 % etwas geringer. Für die Bestimmung der Heptanone im Urin war eine 4-fache Anreicherung durch Extraktion im Volumverhältnis 4:1 (Urin:Cyclohexan) bei einer Extraktionseffizienz von ungefähr 95 % ausreichend.

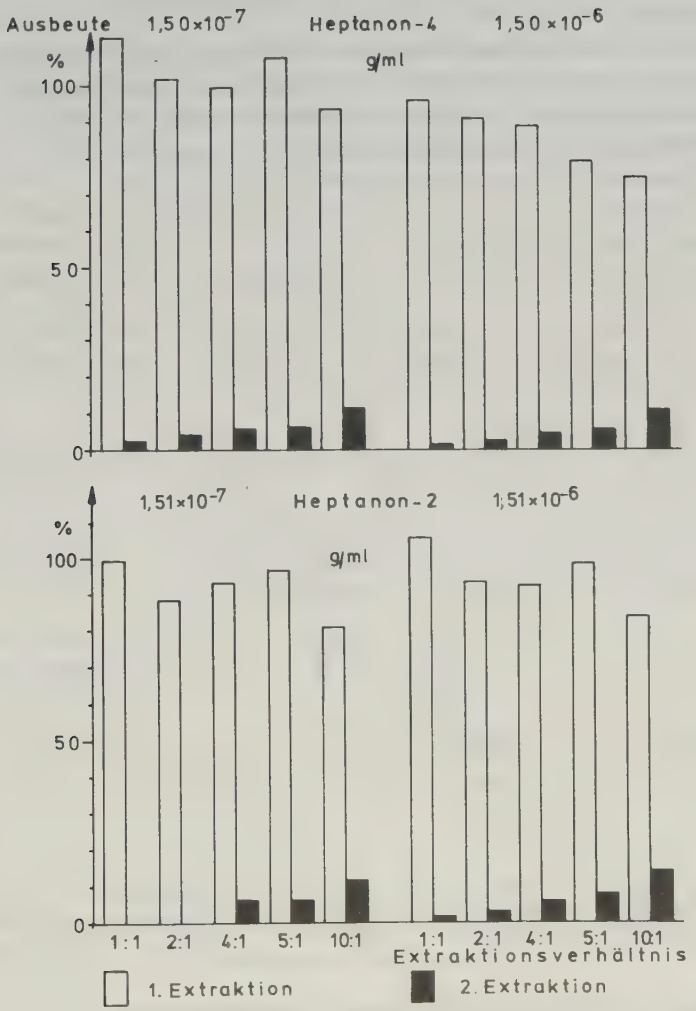

Abb. 9: Ausbeutenbestimmung für die Extraktion wässriger Heptanonlösungen mit Cyclohexan. Die Werte sind das Resultat von Einfachmessungen (C.7.3.2.). Das Extraktionsverhältnis ist jeweils wässriger Standard: Cyclohexanvolumen.

2.3.2. Leistungsfähigkeit der Extraktionsmethode

Zur Auswertung der Heptanon-4 und Heptanon-2 Bestimmung im Urin wurde eine Eichkurve mit Heptanon-3 als innerem Standard (1,53 x 10^{-7} g/ml) ausgemessen (Abb. 10). Die Eichkonzentrationen von Heptanon-4 und Heptanon-2 von

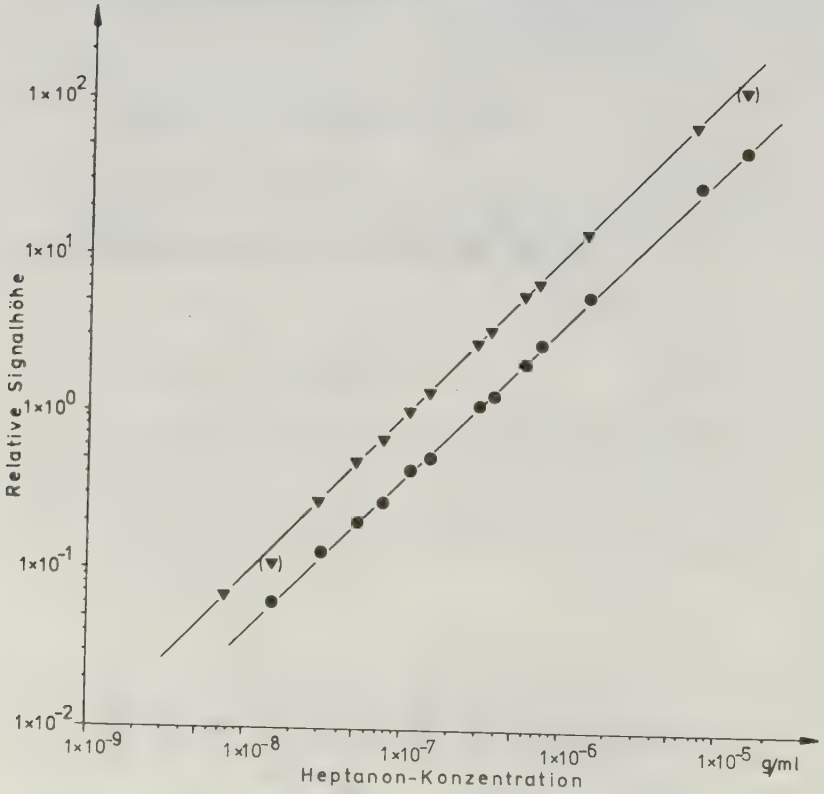

Abb. 10: Eichkurven für Heptanon-4 und Heptanon-2.
▼——▼ Heptanon-4, ●——● Heptanon-2
Die eingeklammerten Werte wurden im Nalimovtest (C.5.3.) signifikant als Ausreißer erkannt und bei der Berechnung der Eichfaktoren nicht berücksichtigt. Alle Werte sind das Ergebnis von Doppelbestimmungen, bei 3 Eichpunkten das Ergebnis von 5-fach Messungen (Tab. 6).

8×10^{-9} bis $1{,}5 \times 10^{-5}$ g/ml deckten den gesamten Meßbereich ab. Die Eichkurven sind im gesamten Konzentrationsbereich streng linear (Korrelationskoeffizient Tab. 4). Daher war es möglich, zur Bestimmung der Heptanonkonzentrationen mit der Methode der Auswertefaktoren Eichfaktoren zu berechnen (C.5.2./5.3.), die im gesamten Konzentrationsbereich gelten (Tab. 4). Die Nachweisgrenze liegt bei diesen Versuchsbedingungen für Heptanon-4 bei 2×10^{-9} g/ml und für Heptanon-2 bei 1×10^{-8} g/ml. Das entspricht einer absoluten Menge von 8 bzw. 40 pg.

Zusätzlich wurden zur Kontrolle aus der Steigung der Ausgleichsgeraden Eichfaktoren berechnet (Tab. 4) (C.5.3.).

Tab. 4: Vergleich der Eichfaktoren

Substanz	$e \times 10^{-7}$	$s \times 10^{-7}$	v	$e \times 10^{-7}$	r_k
	Auswertefaktoren			Ausgleichsgerade	
Heptanon-4	1,14	0,03	2,6	1,11	0,999985
Heptanon-2	2,92	0,19	6,5	3,24	0,99629

Die Eichfaktoren e und die Standardabweichungen s sind in 10^{-7} g/ml angegeben, der Variationskoeffizient v in %, r_k ist der Korrelationskoeffizient.

Ein Vergleich der Eichfaktoren und ihrer Fehler mit den nach anderen Methoden bestimmten Eichfaktoren findet sich in E.1.

Die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode wurde durch 5-fach Messung bei 3 Eichkonzentrationen abgeschätzt (Tab. 5).

Tab. 5: Reproduzierbarkeit der Cyclohexanextraktion

	Heptanon-4		Heptanon-2	
Konzentration	s	v	s	v
0,76	0,01	1,2	0,06	7,9
3,00	0,05	1,7	0,09	3,0
7,6	0,65	8,3	0,24	3,2

Die Konzentration und die Standardabweichung s ist in 10^{-7} g/ml angegeben, der Variationskoeffizient v in %.

Die beste Reproduzierbarkeit wird dann erzielt, wenn die Signalhöhe von innerem Standard und zu messender Substanz annähernd gleich sind. In den Extrembereichen nimmt der Fehler zu. Aber auch dort läßt die Methode eine genügend genaue Bestimmung der Konzentration zu.

2.3.3. Messung der Heptanon-4 und Heptanon-2 Konzentration im Urin

In frischem Urin können nur sehr geringe Mengen von Heptanon-4 und kein Heptanon-2 nachgewiesen werden. Nach Erhitzen des Urins für 90 min bei 90°C in geschlossenen Reaktionsgefäßen steigt die Heptanon-4 Konzentration im dargestellten Fall (Abb. 11) um das 20-fache von 7×10^{-9} auf $1,4 \times 10^{-7}$ g/ml und die Heptanon-2 Konzentration auf 2×10^{-8} g/ml.

Urinextraktion mit Isopropylchlorid, die analog zu C.7.3.2. durchgeführt wurde, und Bestimmung von Pentanon-2 (C.6.3.) zeigte eine entsprechende Temperaturabhängigkeit der Pentanon-2 Bildung. SID-Bestimmung von Cyclohexanon

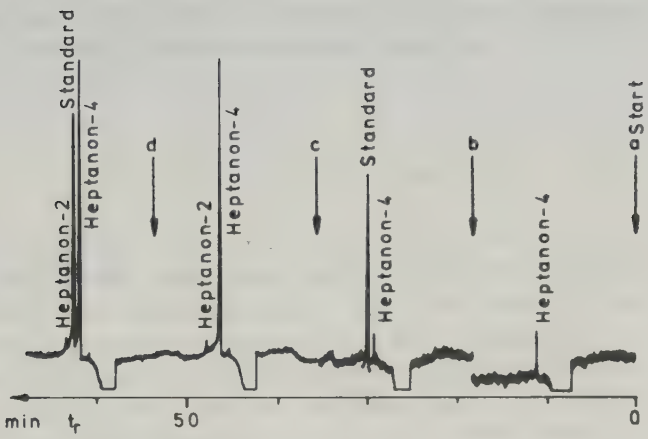

Abb. 11: Massenfragmentogramm m/e = 114. 24 h Urin einer Kontrollperson.
a) Urin nicht erhitzt, Schreibermeßbereich 5 mV.
b) wie a) + innerem Standard, der mit Meßbereich 10 mV registriert wurde.
c) Urin erhitzt, Schreibermeßbereich 10 mV.
d) wie c) + innerem Standard, Schreibermeßbereich 10 mV.
Injiziert wurde jeweils 1 µl Extrakt. Der Abfall der Basislinie wird durch Druckänderung beim Erscheinen des Lösungsmittels verursacht. Die Pfeile markieren den Analysenbeginn.

(m/e = 98) bei einem Diabetiker mit einer hohen Cyclohexanonausscheidung brachte bei den direkt und nach Erhitzen gewonnenen Extrakten die gleichen Cyclohexanonkonzentrationen. Die Verunreinigungen des Cyclohexans (C.6.3.) stören die Messung dieser mindestens 100 mal höheren Konzentration nicht.

Um eine Interferenz mit möglicherweise im Urin ausgeschiedenen Heptanon-3 und der als innerem Standard zugesetzten Menge auszuschließen, wurde bei 20 Patienten erhitzte Urine ohne inneren Standard chromatographiert (Abb. 11c). Dabei wurde weder bei Diabetikern noch bei Kontroll-

personen Heptanon-3 gefunden. Bei den bisher untersuchten Patienten wurde erst einmal, bei einem Patienten mit akuter Porphyrie, mit dieser Methode Heptanon-3 nachgewiesen.

2.3.4. Kinetik der Heptanon-4 Bildung

Um für die quantitative Bestimmung möglichst die gesamte Heptanon-4 Menge zu messen, wurde eine Kinetik der Heptanon-4 Bildung bei 3 verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Abb. 13 zeigt, daß bei verschiedenen Temperaturen die gleiche extrahierbare, maximale Heptanon-4 Konzentration erreicht wird. Die Umwandlung des auf Grund dieser Reaktion zu postulierenden Heptanon-4 Vorläufers läuft offenbar quantitativ ab. Für die Inkubation der Proben zur quantitativen Heptanonbestimmung erschien eine Reaktionszeit von 90 min bei 90°C als ausreichend.

2.3.5. Temperaturabhängigkeit der Heptanon-4 Bildung

Als weitere Charakterisierung der Umwandlungsreaktion des Vorläufers in Heptanon-4 bot sich die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Reaktion an. Abb. 12 zeigt den Arrheniusplot.

Im untersuchten Temperaturbereich zwischen 40° und 99°C ergibt sich eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit von der reziproken absoluten Temperatur. Da die Reaktion auch schon bei physiologischen und wohl auch bei niedrigeren Temperaturen (Zimmertemperatur) abläuft, ist die direkt extrahierbare Heptanon-4 Konzentration im Urin vom Alter der Probe abhängig. Es wurde daher bei den Untersuchungen der Heptanon-4 Ausscheidung nur das nach Erhitzen des Urins extrahierbare Gesamtheptanon-4 bestimmt.

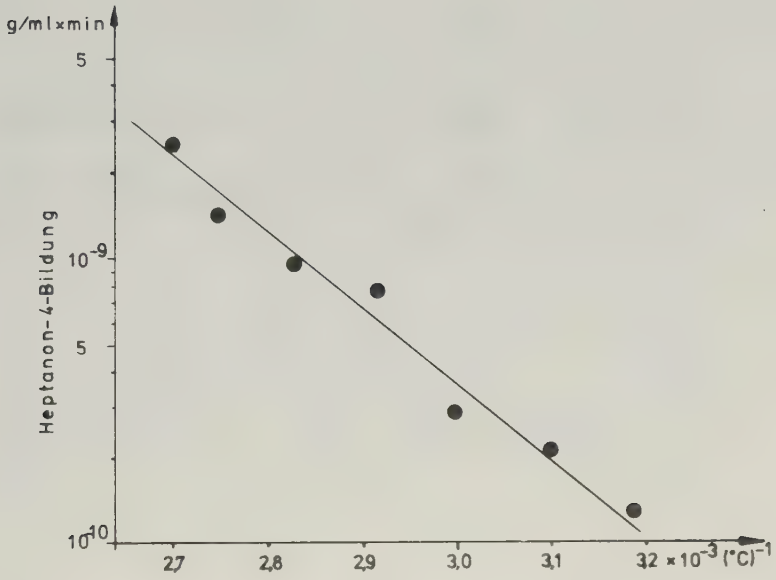

Abb. 12: Arrheniusplot zur Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Umwandlungsreaktion des Vorläufers in Heptanon-4.

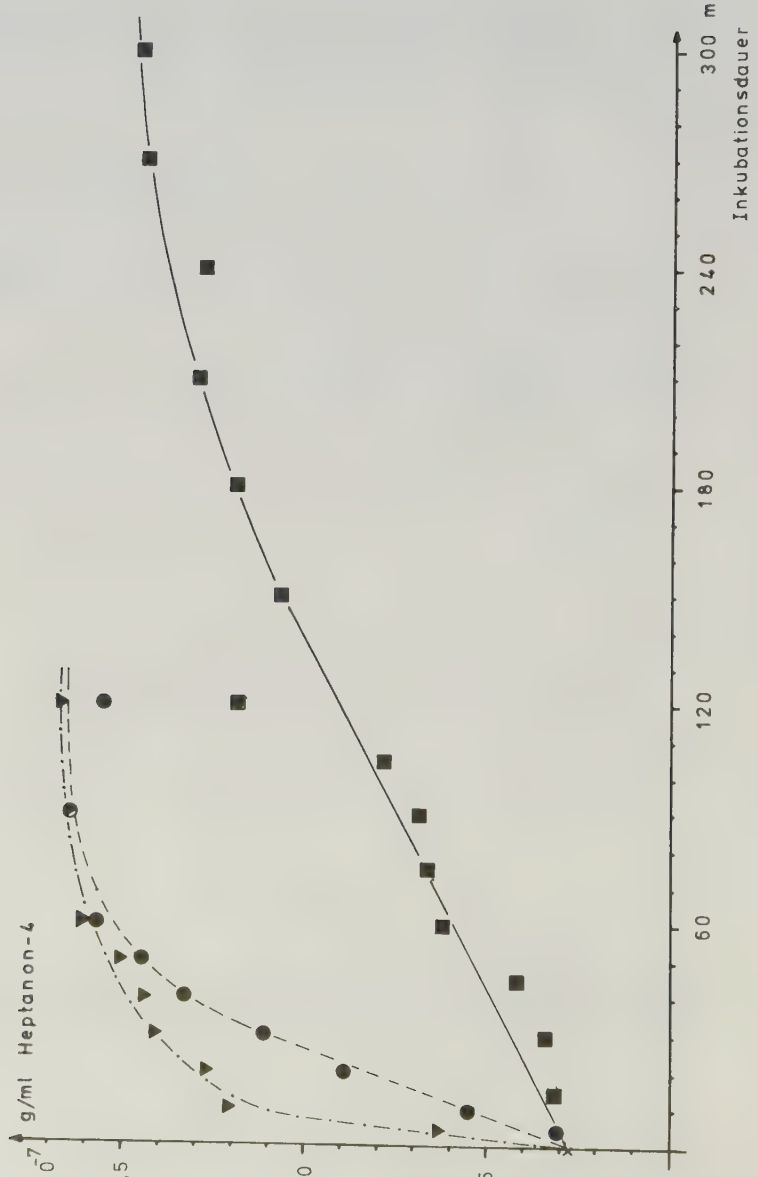
g/ml Heptanon-4
×10⁻⁷
1,5
1,0
0,5
60
120
180
240
300 min
Inkubationsdauer

Abb. 13:

2.3.6. Reproduzierbarkeit der Heptanonbestimmung im Urin

Zur Abschätzung des Fehlers bei der Heptanon-4 bzw. Heptanon-2 Bestimmung wurden die Urine einer Kontrollperson und eines Diabetikers in der Serie 5-fach bestimmt (Tab. 6).

	Heptanon-4			Heptanon-2		
	Konz.	s	v	Konz.	s	v
Normalperson	1,60	0,23	14,4	0,20	0,03	15,0
Diabetiker	10,35	0,95	9,2	0,58	0,08	13,8

Die Konzentrationen und Standardabweichungen s sind in 10^{-7} g/ml angegeben, der Variationskoeffizient v in %.

Bei der Degradationsreaktion des Vorläufers in freies Heptanon treten offenbar Verluste auf, die sich bei kleinen Konzentrationen stärker bemerkbar machen als bei hohen Konzentrationen. Durch die Wahl optimal dichter Reaktionsgefäße läßt sich dieser zusätzliche Fehler wahrscheinlich verkleinern.

---

zu Abb. 13: Heptanon-4 Bildung im 24 h Urin einer Kontrollperson

Reaktion bei 99°C ▼–·—·—▼
Reaktion bei 90°C ●------●
Reaktion bei 70°C ■————■

2.3.7. Praktikabilität der Extraktionsmethode

Standardstabilität: Für die Routinebestimmung der Heptanone ist die Beständigkeit der Lösung des inneren Standards von entscheidender Bedeutung. Zur Bestimmung der Haltbarkeit dieser Lösungen wurden die unter C.7.3.7. bestimmten Auswertefaktoren im t-Test auf Unterschiede geprüft.

In der Kombination von frisch angesetzter Heptanon-4/ Heptanon-3 Lösung ergab sich im Verhältnis zur entsprechenden Kombination der beiden alten Lösungen kein signifikanter Unterschied; d.h. Verluste treten bei beiden Heptanonen im gleichen Umfang auf. Denn die beiden anderen Kombinationen neue Heptanon-4 Lösung/alter innerer Standard hatte einen um 10 % größeren Auswertefaktor, die Kombination alte Heptanon-4 Lösung/neuer Standard einen um 6 % kleineren Auswertefaktor als die frisch angesetzte Lösung. Beide Werte waren im t-Test signifikant vom Vergleichswert verschieden ($\alpha \leq 0{,}01$). Mit der ersten Kombination wurde der Heptanon-3 Verlust, mit der zweiten Kombination der Heptanon-4-Verlust bestimmt. Da die Verluste beider Heptanone gleich sind (s.o.), kann man mit einem mittleren Verlust von 8 % innerem Standard in 8 Wochen rechnen. Damit kann man unter Berücksichtigung des Fehlers der Heptanonbestimmung etwa 4 Wochen mit der gleichen inneren Standardlösung arbeiten.

Extraktbeständigkeit: Die Extrakte der unter D.2.3.6. 5-fach bestimmten Urinproben wurden nach 3 Tagen Lagerung bei $4^{\circ}C$ erneut gemessen. Beim Vergleich der Mittelwerte im t-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied ($\alpha > 0{,}05$). Trotzdem wurden die Extrakte in der Regel am Tage der Herstellung chromatographiert. Mußte die Bestimmung aus technischen Gründen verschoben werden, so erfolgte die Lagerung bei $-30^{\circ}C$.

Probenbeständigkeit: Proben, die nicht sofort aufgearbeitet wurden, wurden in den Reaktionsgefäßen eingefroren und bei -30°C gelagert. Eine wiederholte Bestimmung einer Probe nach 4 Wochen Lagerung ergab bei einer Einfachmessung eine Abweichung von - 15 % bei einer Konzentration von 8×10^{-8} g/ml der frisch bestimmten Probe. Lagerungsverluste sind damit zwar nicht ausgeschlossen aber unwahrscheinlich.

Zeitaufwand für die Bestimmung: Für die Probenvorbereitung und Extraktion wurde für 1 Charge von etwa 25 Proben durchschnittlich 1 h zusätzlich zu den 90 min Inkubationszeit benötigt. Die Zeitdauer der chromatographischen Bestimmung konnte durch überlappende Chromatographie auf 7 - 8 min reduziert werden. Dies war wegen des Fehlens von interferierenden Substanzen möglich. Durch die erhöhte Belastung der Chromatographiesäule traten keine zusätzlichen Fehler bei den Doppelbestimmungen auf (Abb. 14).

Eine Veränderung der Säulenqualität wurde auch nach Bearbeitung von mehr als 300 Proben noch nicht beobachtet. Lediglich der Glaseinsatz des Injektors wurde alle 2-3 Tage, die unbelegte Vorsäule (Länge 30 cm x 0,5 mm i.D.) wöchentlich gereinigt.

3. Bestimmung von Heptanon-4 im Serum

Bei der Umwandlungsreaktion des Vorläufers in extrahierbares Heptanon-4 erstarrt unbehandeltes Serum zu einem nicht extrahierbaren Gel. Daher wurden vor der Inkubation der Proben die Proteine entfernt. Durch Fällung mit gesättigter Pikrinsäurelösung wurde das dichteste Sediment erhalten und daher zur Fällung verwendet.

Wegen der geringen Konzentration von Heptanon-4 im Serum wurde der Meßbereich des Massenspektrometers geändert

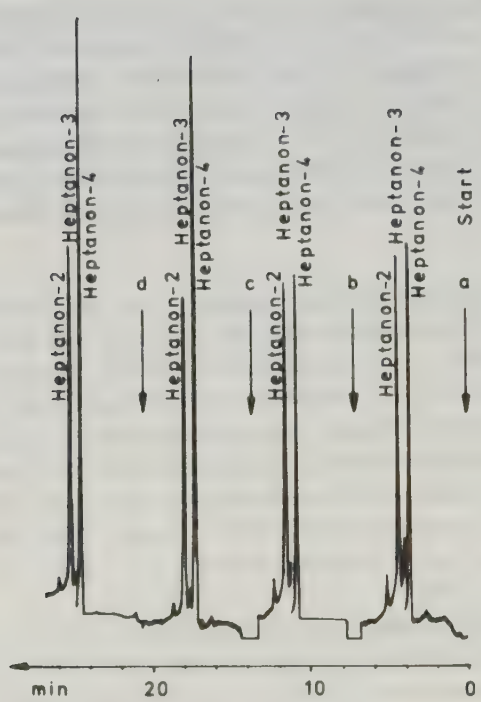

Abb. 14: Doppelbestimmung der Heptanone. Ausschnitt aus einem Meßprotokoll.
a) und b) Doppelbestimmung der Tagesportion des 24 h Urins. Schreibermeßbereich für Heptanon-4 200 mV, sonst 10 mV.
c) und d) Doppelbestimmung der Nachtportion des 24 h Urins, Schreibermeßbereich für Heptanon-4 50 mV, sonst 10 mV.
Der Urin stammte von einem Patienten mit einem juvenilen Diabetes mellitus. Die Pfeile markieren den Startpunkt des jeweils übernächsten Chromatogramms. Der Abfall der Basislinie erfolgt durch Druckänderung beim Erscheinen der Lösungsmittel.

(BDF 0,02), die maximale Verstärkerspannung gewählt und zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses die Chromatographietemperatur auf 75°C gesenkt.

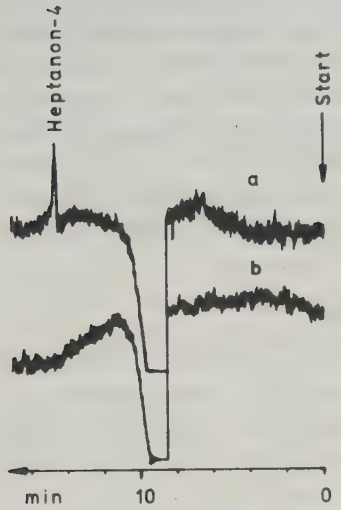

Abb. 15:

Bestimmung von Heptanon-4 im Serum.
a) Fragmentogramm eines Normalserums ohne inneren Standard.
b) Leerwert einer entsprechend behandelten Lösung von Pikrinsäure in aqua bidest.
Schreibermeßbereich 2 mV. Der Pfeil markiert den Startpunkt der Analyse. Der Abfall der Basislinie wird durch Druckänderung beim Erscheinen des Lösungsmittels verursacht.

Eine Einfachbestimmung von 5 Seren von Kontrollpersonen ergab eine Heptanon-4 Konzentration von 0,5 - 1,0 x 10^{-8} g/ml. Im Serum eines bisher untersuchten Diabetikers wurden 5,0 x 10^{-8} g/ml Heptanon-4 gefunden.

4. Charakterisierung des Heptanon-4 Vorläufers

4.1. Ätherextraktion des Heptanon-4 Vorläufers

Die chemische Verwandtschaft von Heptanon-4 und Aceton legt eine ähnliche Entstehung nahe. Aceton entsteht durch spontane Decarboxylierung aus der β-Ketosäure - Acetoessigsäure -. Heptanon-4 entsteht ebenfalls durch eine schon bei Zimmertemperatur ablaufende Reaktion (D.2.3.5.). Die Heptanon-4 entsprechende β-Ketosäure sollte wie viele organische Säuren nach Überführen in die nichtionische Form mit einer starken Mineralsäure mit Äther extrahierbar sein.

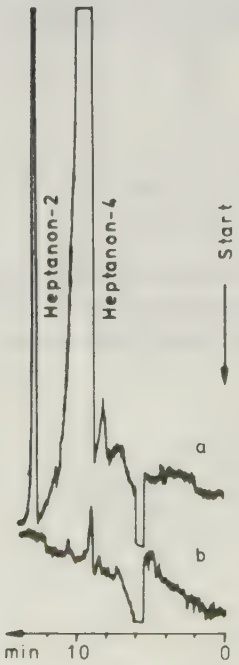

Abb. 16:

Extraktion des Heptanon-4 Vorläufers.
a) Ätherextrakt nach Ansäuern.
b) Ätherextrakt vor Ansäuren nach zweimaliger Cyclohexanextraktion.
Schreibermeßbereich 5 mV. Der Abfall der Basislinie wird durch die Druckänderung beim Erscheinen des Lösungsmittels verursacht.

Durch Vorextraktion mit Cyclohexan wurde freies Heptanon-4 entfernt (C.8.1.). Nachgewiesen wurde der Vorläufer im Ätherextrakt nach thermischer Zersetzung (150°C) im Injektor als Heptanon-4. Für das gleichzeitig entstehende Heptanon-2 ist ebenfalls ein entsprechender Vorläufer zu fordern (Abb. 16).

4.2. Versuch zur Identifizierung des Heptanon-4 Vorläufers

Um den Vorläufer, hypothetisch eine β-Ketosäure, in eine stabile, möglichst chromatographierbare Form zu überführen, wurde mit den eingeengten Extrakten (C.8.2.) eine Veresterungsreaktion mit Bortrifluorid - Methanol Komplex durchgeführt. Nach Extraktion des Reaktionsgemischs mit Isopropylchlorid wurden die Reaktionsprodukte chromatographiert. Es wurden gleichzeitig ein Massenfragmentogramm m/e = 172 dem Molekularpeak des vermuteten Esters und ein Totalionenstromchromatogramm registriert (C.6.4.). Eine Zuordnung des Fragments zu einer bestimmten gaschromatographischen Bande war jedoch nicht möglich, da der Isotopenpeak m/e = 172 des bei vielen Verbindungen auftretenden Fragments m/e = 171 störte. Außerdem ergab die Chromatographie der Vergleichssubstanz Acetoessigsäuremethylester, daß die Methylester der β-Ketosäuren unter den angewendeten Bedingungen sehr schlecht zu chromatographieren sind.

5. Ergebnisse der Heptanonbestimmung im Urin

5.1. Verteilung der Heptanon-4 und Heptanon-2 Ausscheidung bei den Patientengruppen

Untersucht wurden insgesamt 197 24 h Sammelurine von insgesamt 78 Personen. Die Werte für die 24 h Ausscheidung von Heptanon-4 und Heptanon-2 sind bis auf wenige Ausnahmen als Mittelwert aus Doppelwerten berechnet.

Für den Vergleich der Heptanonausscheidung bei Gesunden und Diabetikern mit verschiedenen Schweregraden der Stoffwechselstörung wurde folgende Gruppeneinteilung vorgenommen:

Gruppe I — Gesunde Kontrollpersonen (n = 14)

D.h. kein Anhalt für Diabetes mellitus, kein Übergewicht. Schnelltest auf Glukose, Aceton und Eiweiß im untersuchten Urin negativ.

Gruppe II — Kontrollpatienten (n = 10)

Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, aber ohne diabetische Stoffwechselstörung.

Gruppe III — leichte diabetische Stoffwechselstörung vom Typ des Altersdiabetes (n = 15)

Die Stoffwechselstörung konnte allein mit Diät kompensiert werden.

Gruppe IV — Diabetiker mit ausgeprägterer Stoffwechselstörung (n = 16)

Die Behandlungskombination bestand hier aus oralen Antidiabetika und Diät. Bis auf 1 Fall wurden alle Patienten mit Sulfonylharnstoffen behandelt.

Gruppe V — Insulinpflichtige Diabetiker (n = 18)

mit Behandlungskombination von Insulininjektionen und Diät.

Gruppe VI Juvenile Diabetiker (n = 5)

als Sonderform von Gruppe V, die sich durch äußerst labilen Stoffwechsel und vollständige Insuffizienz des Insulin produzierenden Apparates auszeichnet.

In Abb. 17 ist die Verteilung der Heptanon-4 Ausscheidung/24 h in Klassen zu 100 µg sowohl für die Gesamtzahl der untersuchten Personen als auch für die einzelnen Gruppen dargestellt. Jeder Patient ist in dieser Darstellung nur mit einem Wert vertreten. Wurde bei einem Patienten die 24 h Heptanon-4 Ausscheidung an mehreren Tagen bestimmt, so wurde aus diesen Werten der Mittelwert gebildet.

In der Verteilung für die Gesamtpopulation finden sich Maxima bei 100-200 µg/24 h, 400-500 µg/24 h, 1000-1100 µg/24 h und in der Restklasse > 2000 µg/24 h. Das Maximum bei 100-200 µg/24 h entspricht den Maxima der relativen Häufigkeit bei den Gruppen der Kontrollpersonen und Kontrollpatienten. In der Restklasse Heptanon-4/24 h > 2000 µg finden sich nur Diabetiker mit einer ausgeprägten Stoffwechselstörung. Die Häufung der juvenilen Diabetiker in dieser Klasse muß aber wegen der geringen Fallzahl (n = 5) als vorläufiges Ergebnis betrachtet werden. Die Entscheidung, ob die beiden übrigen Maxima der relativen Häufigkeit ebenfalls einer bestimmten Gruppe zugeordnet werden können, kann erst durch eine umfangreichere Untersuchung getroffen werden. Deutlich ist noch zu erkennen, daß die Ausscheidungswerte bei den Diabetikergruppen breit über den gesamten Meßbereich verteilt sind.

Entsprechend eindeutige Unterschiede konnten für die Heptanon-2 Ausscheidung nicht gefunden werden (Abb. 18). Die Mengen des ausgeschiedenen Heptanon-2 ist jedoch 10 - 20 mal kleiner als die ausgeschiedenen Heptanon-4 Mengen und die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen weniger stark ausgeprägt.

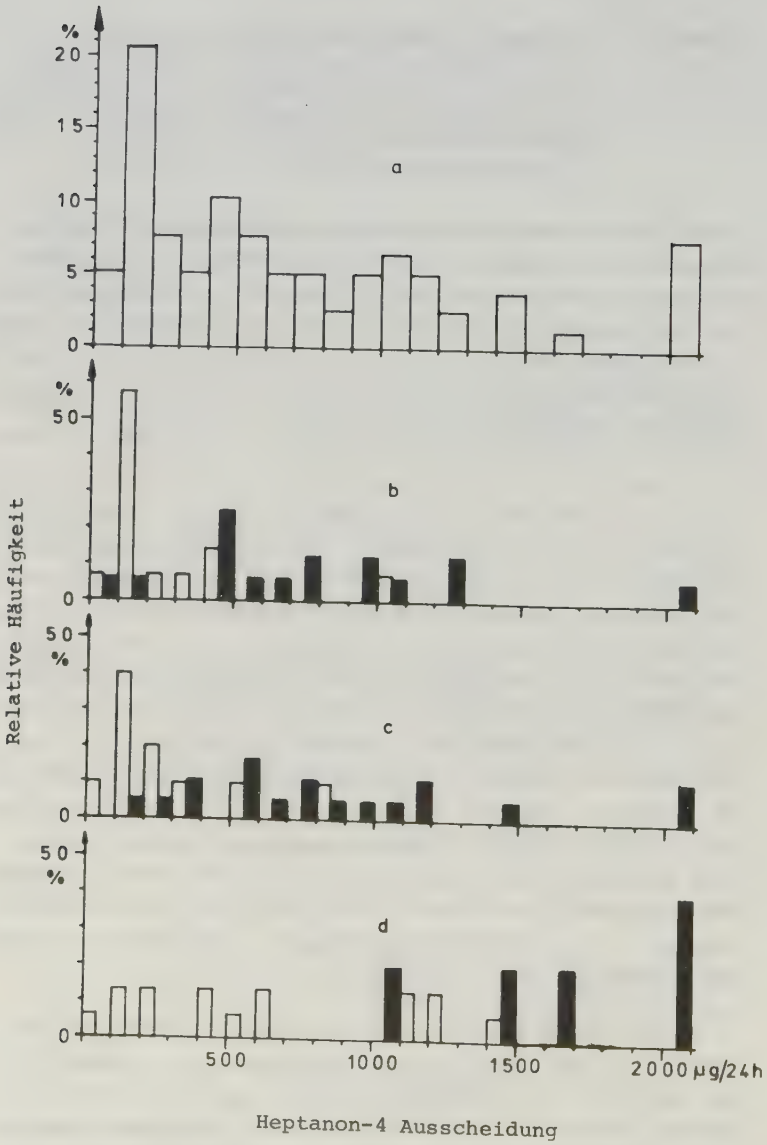
%
20
15
10
5
0
a
%
50
0
b
50
%
0
c
50
%
0
d
Relative Häufigkeit
500
1000
1500
2000 µg/24h
Heptanon-4 Ausscheidung

Abb. 17:

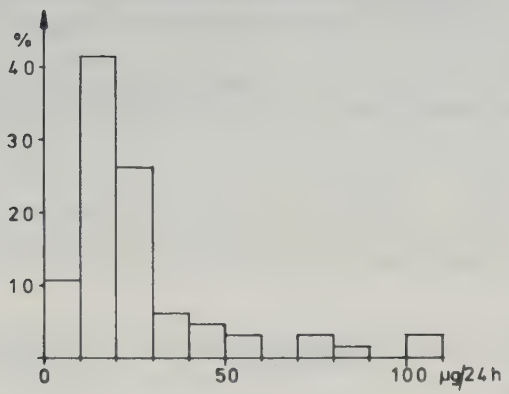

Abb. 18: Histogramm zur Verteilung der Heptanon-2 Ausscheidung bei der Gesamtpopulation. Klassenbreite 10 µg/24 h. Restklasse 100-110 µg/24 h enthält alle Werte > 100 µg/24 h.

---

zu Abb. 17: Histogramm zur Verteilung der Heptanon-4 Ausscheidung bei den untersuchten Personen. Aus Darstellungsgründen wurden in Abb. 17b-c jeweils 2 Gruppen pro 100 µg Klasse aufgetragen.
Abb. 17a: Gesamtverteilung
17b: weiß Gruppe I, schwarz Gruppe IV
17c: weiß Gruppe II, schwarz Gruppe V
17d: weiß Gruppe III, schwarz Gruppe VI.

5.2. Mittelwerte der Heptanonausscheidung bei den einzelnen Patientengruppen

Die Ausscheidungsmittelwerte für die einzelnen Personengruppen wurden aus den Mittelwerten für die einzelnen Patienten berechnet (Tab. 7).

Tab. 7: Mittelwerte der Heptanonausscheidung bei den verschiedenen Personengruppen

	Heptanon-4			Heptanon-2		
Gruppe	n	x	s	n	x	s
I	14	286	261	14	21,6	8,9
II	10	289	260	10	22,8	19,9
III	15	631	435	7	28,9	23,6
IV	16	793	525	14	24,0	28,0
V	18	860	562	17	33,7	32,0
VI	5	2070	1015	3	35,6	5,7

n ist die Zahl der jeweils untersuchten Personen. x sind Gruppenmittelwerte in µg/24 h. s ist die Gruppenstandardabweichung, in diesem Fall die biologische Streuung, in µg/24 h.

Es zeigt sich (Tab. 7), daß mit der Schwere der diabetischen Stoffwechselstörung der Mittelwert der durchschnittlich ausgeschiedenen Heptanon-4 Mengen ansteigt. Für die Heptanon-2 Ausscheidung ist dieser Anstieg nicht so deutlich. Gleichzeitig nimmt die biologische Streuung der Werte mit der Schwere der Erkrankung zu. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten wurde mit dem t-Test beurteilt. Zwischen den Kontrollpersonen und Kontrollpatienten konnte kein Unterschied festgestellt werden ($\alpha > 0{,}975$). Ein wahrscheinlicher Unterschied ergab sich zwischen diesen Gruppen und den nur diätetisch behandelten

Diabetikern ($\alpha < 0{,}025$). Zu allen anderen Gruppen waren die Unterschiede von den Kontrollgruppen signifikant ($\alpha < 0{,}01$). Zwischen den Gruppen III - V konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Alle Gruppen unterschieden sich jedoch signifikant ($\alpha < 0{,}01$) von der Gruppe der juvenilen Diabetiker.

In der Heptanon-2 Ausscheidung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden.

5.3. Korrelation der Heptanon-4 Ausscheidung mit anderen klinisch chemischen Parametern

In Abb. 19 ist über 15 Tage hinweg der Verlauf von Blutzucker, Urinzuckerausscheidung und Heptanon-4 Ausscheidung eines Patienten dargestellt. Bei dem 35-jährigen Patienten war nach 5-jähriger Krankheitsdauer wegen zunehmenden Anstiegs der Blutzuckerwerte eine Umstellung der Behandlung von oralen Antidiabetika auf Insulin notwendig geworden.

Zwischen der ausgeschiedenen Urinzuckermenge und der Heptanon-4 Ausscheidung läßt sich 2 mal deutlich ein gegensätzliches Verhalten, etwa am 23.5. und 7.6., beobachten. Die genaue Ursache für diese Änderungen, besonders am 7.6., ist unbekannt. An den übrigen Tagen verhalten sich Urinzucker- und Heptanon-4 Ausscheidung annähernd parallel. An Tagen mit hohen Blutzuckerwerten (23.5.) zeigen sich eher niedrige Heptanon-4 Werte. Ein direkter Einfluß der applizierten Insulinmengen ist nicht ersichtlich. Die Heptanon-2 Ausscheidung wurde nicht abgebildet, da sich vollständig parallel zur Heptanon-4 Ausscheidung verhielt. Lediglich der Anstieg am 7.6. war nicht so stark ausgeprägt.

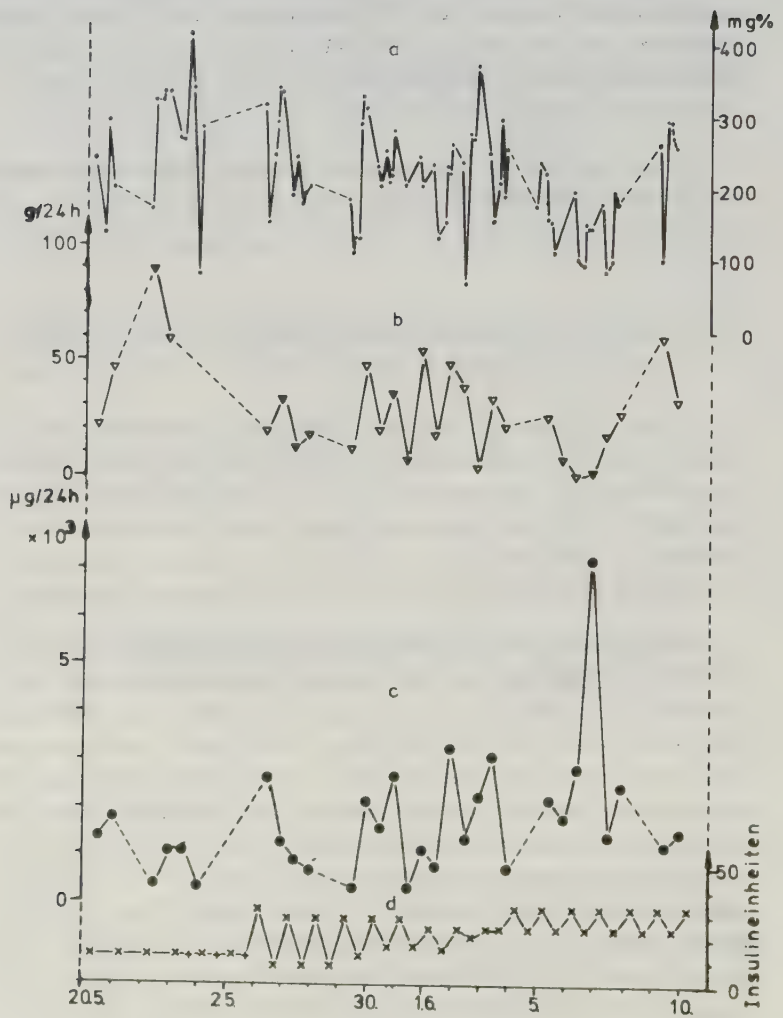
mg%
400
300
200
100
0
a
g/24 h
100
50
0
b
µg/24h
× 10³
5
0
c
d
50
0
Insulineinheiten
20.5.
25.
30.
1.6.
5.
10.

Abb. 19:

5.4. Heptanon-4 Ausscheidung bei dekompensiertem Kohlenhydratstoffwechsel

Für die Aufklärung der Rolle des Heptanon-4 im Stoffwechsel wäre es wünschenswert gewesen, seine Ausscheidung bei Diabetikern im Präkoma oder Koma zu messen und mit den anderen Stoffwechselparametern zu vergleichen. Aus organisatorischen Gründen gelang es doch meist nicht, rechtzeitig während der für den Patienten kritischen Stoffwechselsituation Untersuchungsmaterial zu erhalten.

Es wird daher nur der Fall eines 58-jährigen Patienten mit einem insulinpflichtigen Diabetes angeführt.

An 2 aufeinander folgenden Tagen kam der Patient von einem hyperglykämischen Zustand (Blutzucker 609 mg%) am 1. Tag in einen hypoglykämischen Zustand am folgenden Tag (Blutzucker 24 mg%). Die ausgeschiedene Heptanon-4 Menge stieg von 166 µg/24 h am ersten Tag auf 907 µg/24 h am zweiten Tag.

---

zu Abb. 19: Korrelation der Heptanon-4 Ausscheidung mit anderen Stoffwechselparametern bei einem 35-jährigen Patienten mit einem juvenilen Diabetes mellitus. Die Verbindungslinien der Meßpunkte wurden gestrichelt, wenn Meßpunkte von nicht aufeinander folgenden Tagen verbunden wurden. a:·——·Blutzucker; b:▽——▽Urinzuckerausscheidung; c:●——●Heptanon-4 Ausscheidung; d:×——× Insulindosen, x Depotinsulin, + Altinsulin. Die Heptanon-4 Ausscheidung wurde für Tages- und Nachtportion des 24 h Sammelurins getrennt bestimmt und die Meßpunkte am mittleren Zeitpunkt der Sammelperiode eingetragen.

E. DISKUSSION

1. Vergleich der verschiedenen zur Heptanonbestimmung verwendeten Methoden

Für die Heptanonbestimmung wurden Eichkurven sowohl durch die Verfahren der Direktinjektion, der Kopfraumanalyse und der Extraktionsmethode bestimmt. Aus diesen Eichkurven wurden sowohl nach dem Verfahren der Auswertefaktoren wie aus der Steigung der Regressionsgeraden Eichfaktoren berechnet (C.5.3.). Diese Werte sind zusammen mit ihren Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sowie den Korrelationskoeffizienten in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Für alle Methoden der Heptanon-4 Bestimmung ergibt sich in guter Übereinstimmung ein Eichfaktor von 1,11 - 1,18 x 10^{-7} g/ml. Die Eichfaktoren für Heptanon-2 zeigen mit Werten zwischen 2,89 und 3,61 x 10^{-7} g/ml deutliche Unterschiede bei der Berechnung nach der Methode der Auswertefaktoren und nach Berechnung aus der Steigung der Regressionsgeraden. Dieser Effekt kommt durch den Y-Achsenabschnitt der Eichgeraden zustande, der bei der Methode der Auswertefaktoren nicht berücksichtigt wird. In diesem Fall sind die aus der Ausgleichsgeraden berechneten Eichfaktoren vorzuziehen. Hier wurden sie jedoch nicht verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Auswertung nicht zur Verfügung standen. Doch auch die Methode der Auswertefaktoren bietet Vorteile; so läßt sich mit ihrer Hilfe eine neu angesetzte innere Standardlösung mit wenigen Messungen bei einer Konzentration ein mittlerer Auswertefaktor berechnen und mit dem alten Wert vergleichen.

Die deutliche Abweichung der beiden durch Direktinjektion von Cyclohexanlösungen gewonnenen Eichfaktoren von Heptanon-2 läßt sich am ehesten mit einem Pipettierfehler erklären. Durch die geringe Viskosität organischer Lösungsmittel ist die Gefahr der Fehlmessung bei Verwendung pneu-

Tab. 8: Übersicht über die mit den verschiedenen Methoden bestimmten Eichfaktoren und ihre Fehler. Die Eichfaktoren e und die Standardabweichung s sind in 10^{-7} g/ml angegeben, der Variationskoeffizient v in %. r ist der Korrelationskoeffizient.
a) Auswertung nach dem Verfahren der Auswertefaktoren
b) Auswertung unter Berechnung der Regressionsgeraden

Meßmethode	Auswertung	Heptanon-4			Heptanon-2			Pentanon-2			Cyclohexanon		
		e	s	v	e	s	v	e	s	v	e	s	v
Kopfraum-analyse	a	1,11	0,04	4,0	2,89	0,24	8,6						
	b	1,15	(r=0,99910)		3,26	(r=0,99575)							
Direktinjection von Cyclohexanlösungen	a	1,13	0,08	6,9	3,27	0,26	8,5						
	b	1,18	(r=0,99945)		3,61	(r=0,99997)							
Extraktionsmethode	a	1,14	0,03	2,6	2,92	0,19	6,5						
	b	1,11	(r=0,99999)		3,24	(r=0,99629)							
Direktinjektion von Isopropylchloridlösungen (MID Technik)	a							6,13	1,12	18,3	9,71	1,79	18,4
	b							7,48	(r=0,99536)		9,54	(r=0,99594)	

matischer Pipetten, die aus Praktikabilitätsgründen benutzt wurden, vergrößert. Ebenso ist dieser Sachverhalt für den großen Fehler der Eichfaktoren von Pentanon-2 und Cyclohexanon zu diskutieren, die aus den mit der MID Einheit gemessenen Eichkurven (C.6.3.) berechnet wurden.

Der entscheidende Vorteil der Extraktionsmethode gegenüber dem Verfahren der Kopfraumanalyse besteht in der größeren Praktikabilität, besonders in einer kürzeren Probenvorbereitung, Analysendauer und einer geringeren Anfälligkeit gegen Kontaminationen. Vorteile bietet die Methode der Kopfraumanalyse kombiniert mit Adsorption an Tenax durch ihr breiteres Anwendungsspektrum nur, wenn man mit absolut höheren Substanzmengen arbeiten und die Aufarbeitung - theoretisch exakt - durch Äquilibrierung durchführen kann (16,17,18). Eine praktische Anwendung könnte diese Methode bei der quantitativen Analyse flüchtiger Komponenten der Atemluft finden.

2. Interferenzen mit dem inneren Standard

Heptanon-3 konnte qualitativ von verschiedenen Autoren durch Verfahren der Kopfraumanalyse im Urin nachgewiesen werden (1,5,6). Ein Vergleich der Heptanonpeakhöhen der in der Literatur dargestellten Chromatogramme zeigt, daß die Heptanon-3 Konzentration nicht größer als 5 % der Heptanon-2 Konzentration ist. Diese Menge liegt jedoch mit Sicherheit unterhalb der Nachweisgrenze der in dieser Arbeit entwickelten Methode und kann, wie die Kontrolle von 20 Urinproben von verschiedenen Patienten gezeigt hat, die Bestimmung nicht beeinflussen. Eine relative Kontrolle besteht außerdem in der Signalhöhe des inneren Standards. Meßbare Heptanon-3 Mengen wären am ehesten bei Diabetikern zu erwarten und würden die bestimmten Konzentrationen in Richtung kleinerer Werte verfälschen; d.h. aber die gefundenen Unterschiede zwischen Normalpersonen und Diabetikern

wären eher zu klein angegeben. Eine weitere Kontrolle empfiehlt sich allerdings bei der Heptanonbestimmung im Urin von Patienten mit anderen Stoffwechselerkrankungen (z.B. akute Porphyrie, s.S. 42).

3. Die Bedeutung von Heptanon-4 im Stoffwechsel

Heptanon-4 entsteht durch eine temperaturabhängige, schon bei physiologischen Temperaturen spontanablaufende Reaktion aus einem noch nicht genau charakterisierten Vorläufer - wahrscheinlich einer β-Ketosäure. Wegen der wesentlich höheren Konzentration dieses Vorläufers in den untersuchten biologischen Substraten kommt ihm wohl die eigentliche Bedeutung im Stoffwechsel zu. Die Heptanon-4 Konzentration stellt nur eine leichter zugängliche Form für die quantitative Bestimmung dieser Substanz dar. Im folgenden ist daher mit der Heptanon-4 Konzentration die Konzentration dieser Vorläufersubstanz gemeint.

4. Nimmt der Heptanon-4 Vorläufer am Metabolismus teil?

Aus der Heptanon-4 Konzentration im Serum von Kontrollpersonen von 5 - 10 x 10^{-9} g/ml läßt sich über die mittlere glomeruläre Filtrationsrate (120 ml/min, 19) eine theoretische Ausscheidung für Heptanon-4 im Urin von 0,9 - 1,7 x 10^{-3} g/24 h berechnen. Dieser Wert ist aber 3-6 mal größer als der tatsächlich gefundene Wert von ca. 2,8 x 10^{-4} g/24 h. Aus diesem Unterschied läßt sich eine Metabolisierung des Heptanon-4 Vorläufers oder seine tubulare Rückresorption postulieren. Ungeklärt ist natürlich, ob der Vorläufer nicht auch auf andere Weise, etwa durch Abatmen über freies Heptanon-4, ausgeschieden werden kann.

5. Bedeutung des Heptanon-4 Vorläufers im Stoffwechsel

Nach Befunden von O. Babbili (20) und mir beobachtet man eine Erniedrigung der Heptanon-4 Ausscheidung während massiver Hyperglykämien (Blutzucker 400 mg%, (10), D.5.4.) und während einer Nulldiät (21). Eine eigene Studie zeigte, daß bei konstantem Kohlenhydratangebot ein Zusammenhang der Heptanon-4 Bildung mit der Glukoseverwertung, gemessen über die tägliche Glukoseausscheidung, besteht. Offensichtlich wird bei mangelhaftem Glukoseangebot oder gestörter Glukoseverwertung wenig Heptanon-4 gebildet, während bei Kompensation dieser Störung kurzfristig große Heptanon-4 Mengen gebildet werden.

Hypothetisch kann man annehmen, daß während dieser Glukoseverwertungsstörung der Energiebedarf vorzugsweise durch Lipolyse gedeckt wird und anfallende Acylverbindungen durch die erfolgte Enzymadaption an das Substratangebot schnell metabolisiert werden. Während der Rekompensationsperiode mit Phasen erhöhter Lipogenese kommt es vermutlich passager zu einer erhöhten Konzentration von aktivierten längerkettigen Acylverbindungen. Besonders aus aktivierten Buttersäureresten könnte der vermutete Heptanon-4 Vorläufer im Sinne einer enzymatisch vermittelten Kondensationsreaktion CH-acider Verbindungen entstehen. In dieses Modell paßt auch die zunehmende Höhe und Streuung der Heptanon-4 Ausscheidung bei den Diabetikern mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung. Mit zunehmender Insuffizienz des Inselapparates wird die Regulation der Brennstoffe des Stoffwechsels wesentlich ungenauer und ihre Konzentration im Blut zunehmend von Nahrungsaufnahme, Medikamentenangebot und Verbrauch bestimmt. Daher sollten die erwähnten Übergangsphasen häufiger auftreten und somit die Heptanon-4 Ausscheidung ansteigen.

Zur endgültigen Aufklärung der Stoffwechselfunktion und der diagnostischen Wertigkeit von Heptanon-4 sind die Korrelation der Heptanon-4 Konzentration im Serum mit dem

Blutzucker, den Ketonkörpern, den freien Fettsäuren und der Insulinaktivität von vorrangiger Bedeutung. Ebenso kann eine Identifizierung des Heptanon-4 Vorläufers wesentliche Anhaltspunkte für diese beiden Bereiche liefern.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1) Zlatkis, A.; Liebich, H.M.
Profile of Volatile Metabolites in Human Urine
Clin. Chem. 17, 592-594, 1971

2) Teranishi, R.; Mon, T.R.; Robinson, A.B.; Cary, P.; Pauling, L.
Gaschromatography of Volatiles from Breath and Urine
Anal. Chem. 44, 18-20, 1972

3) Zlatkis, A.; Lichtenstein, H.A.; Tishbee, A.
Concentration and Analysis of Trace Volatile Organics in Gases and Biological Fluids with a New solid Adsorbent
Chromatographia 6, 67-70, 1973

4) Zlatkis, A.; Lichtenstein, H.A.; Tishbee, A.; Bertsch, W.; Shunbo, F.; Liebich, H.M.
Concentration and Analysis of Volatile Urinary Metabolites
J. of Chrom. Sci. 11, 299-302, 1973

5) Matsumoto, K.E.; Partridge, D.H.; Robinson, A.B.; Pauling, L.; Flath, R.A.; Mon, T.R.; Teranishi, R.
The Identification Of Volatile Compounds in Human Urine
J. of Chrom. 85, 31-34, 1973

6) Zlatkis, A.; Bertsch, W.; Lichtenstein, H.A.; Tishbee, A.; Shunbo, F.; Liebich, H.M.; Coscia, A.M.; Fleischer, N.
Profile of Volatile Metabolites in Urine by Gas-Chromatography - Mass Spectrometry
Anal. Chem. 45, 763-767, 1973

7) Liebich, H.M.; Al-Babbili, O.
Gas Chromatographic - Mass Spectrometric Study Of Volatile Organic Metabolites In Urines Of Patients With Diabetes Mellitus
J. of Chrom. 112, 539-550, 1975

8) Liebich, H.M.
Specific Detection Of Volatile Metabolites In Urines Of Normal Subjects And Patients With Diabetes Mellitus Using Computerized Mass Fragmentography
J. of Chrom. 112, 551-557, 1975

9) Kaiser, R.
Chromatographie in der Gasphase Bd IV, Teil I
2. Aufl. Bibl. Inst. Mannheim 1969

10) Hewlett Packard (Herstellerfirma)
HP-55 Bedienungshandbuch

11) Kaiser, R.; Gottschalk, G.
Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten
Bibl. Inst. Mannheim, 1972

12) Documenta Geigy
Wissenschaftliche Tabellen, Basel 1968, 7. Aufl.

13) Moore, W.J.
Physical Chemistry
4. Edition, Longmans, London 1963

14) Morrison, Smith
J. Lipid Research 5, 600, 1964
Cit. nach Angaben von Dr. H.M. Liebich

15) Saylor, J.H.; Baxt, V.J.; Gross, P.M.
Solubility Studie VIII. The Solubilities of Some Isomeric Ketones in Water
J. Am. Chem. Soc. 64, 2742-2744, 1942

16) Novák, J.; Vasák, J.; Janák, J.
Chromatographic Method for the Concentration of Trace Impurities in the Atmosphere and other Gases
Anal. Chem. 37, 660-666, 1965

17) Gelbičová-Růzičová, J.; Novák, J.; Janák, J.
Application Of The Method Of Chromatographic Equilibration To Air Pollution Studies
The Determination Of Minute Amounts Of Halothane In The Atmosphere Of An Operating Theatre
J. of Chrom. 64, 15-23, 1972

18) Janák, J.; Růzičová, J.; Novák, J.
Effect Of Water Vapour In The Quantification Of Trace Compounends Concentrated By Frontal Gas Chromatography On Tenax GC
J. of Chrom. 99, 681-696, 1974

19) Keidel, W.D.
Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie
2. Aufl. Thieme, Stuttgart 1970

20) Al-Babbili, O.
Untersuchung der flüchtigen Komponenten im Urin von Diabetikern
Dissertation Tübingen 1977

21) Liebich, H.M.
Private Mitteilung

LEBENSLAUF

Am 5. November 1947 wurde ich, Gert Huesgen, als ältestes von drei Kindern des kaufmännischen Angestellten Heinrich Huesgen und seiner Ehefrau Erne Huesgen, geb. Westermann, in Mönchengladbach geboren. Nach Besuch von Grundschule und Gymnasium beendete ich meine Schulausbildung am 2. November 1966 mit dem Abitur am städt. math.-naturw. Gymnasium in Mönchengladbach. Nach zwischenzeitlicher Tätigkeit als Praktikant bei der I. R. Geigy AG in Basel begann ich im Sommersemester 1967 das Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Gleichzeitig nahm ich an einem einjährigen studium fundamentale im damaligen Leibniz Kolleg der Universität teil. Ab Sommersemester 1972 belegte ich zusätzlich das Fach Humanmedizin. Am 30. September 1973 erhielt ich nach Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Bayer über ein Thema aus der Naturstoffchemie das Diplom.

Seit April 1974 bin ich verheiratet.

Die vorliegende Arbeit wurde von Anfang 1975 bis Ende 1976 unter der Anleitung von Dr. H. M. Liebich im Labor der medizinischen Universitätsklinik in Tübingen durchgeführt. Am 16. Oktober 1978 bestand ich die ärztliche Prüfung.